

(19) 世界知的所有權機關  
國際事務局



(43) 國際公開日  
2001 年 4 月 19 日 (19.04.2001)

## PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/27263 A1

**(51) 國際特許分類<sup>7</sup>:** C12N 15/11,  
A61K 31/70, C12Q 1/68, G01N 33/15

(21) 國際出願番号: PCT/JP00/01969

(22) 國際出願日: 2000 年3 月29 日 (29.03.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/288677 1999年10月8日(08.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: クマール ペンメッチャ (KUMAR, Penmetcha) [IN/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木2-16-4 306-303 Ibaraki (JP). 山本利香 (YAMAMOTO, Rika) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮2-10-4 ニューハイツ 木村203 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

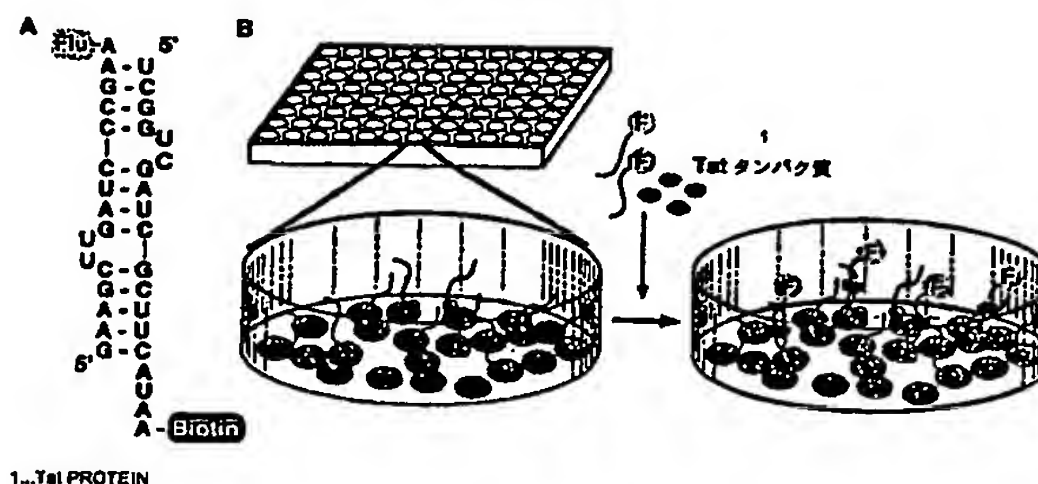
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類：  
一 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

**(54) Title:** MODULATE APTAMER AND METHOD FOR DETECTING TARGET PROTEIN BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: モジュレートアプタマー及びこれを用いた標的タンパク質の検出方法



**(57) Abstract:** Attempts have been made to establish a novel strategy for providing an effective biosensor which is stabilized via the formation a conjugate exclusively in the presence of a target protein or a substance to be analyzed. A modulate aptamer binding specifically to a specific target protein, in particular, Tat protein of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1); and a method and a kit for detecting a target protein, in particular, HIV-1Tat protein by using the same.

〔続葉有〕

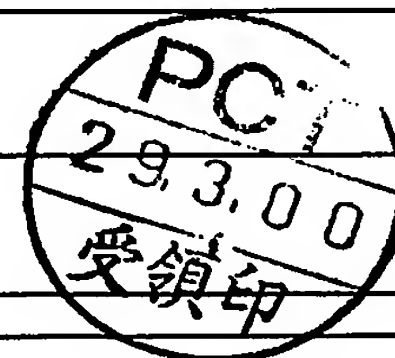
**WO.01/27263 A1**

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-933-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月29日（29.03.2000）水曜日 13時14分03秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101	
0-4-1	この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	PH-933-PCT
I	発明の名称	モジュレートアダプター及びこれを用いた標的タンパク質の検出方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	工業技術院長が代表する日本国
II-4en	Name	JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
II-5ja	あて名:	100-8921 日本国 東京都 千代田区 霞が関一丁目3番1号
II-5en	Address:	3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-I	その他の出願人又は発明者	
III-I-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-I-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
III-I-4ja	氏名(姓名)	クマール ペンメッチャ
III-I-4en	Name (LAST, First)	KUMAR, Penmetcha
III-I-5ja	あて名:	305-0044 日本国 茨城県 つくば市 並木2-16-4 306-303
III-I-5en	Address:	306-303, 2-16-4, Namiki Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0044 Japan
III-I-6	国籍 (国名)	インド IN
III-I-7	住所 (国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月29日（29.03.2000）水曜日 13時14分03秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) すべての指定国 (all designated States)
III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja III-2-5en	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:	山本 利香 YAMAMOTO, Rika 305-0051 日本国 茨城県 つくば市 二の宮2-10-4 ニューハイツ木村203 New-heights-Kimura 203, 2-10-4, Ninomiya Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0051 Japan
III-2-6 III-2-7	国籍 (国名) 住所 (国名)	日本国 JP 日本国 JP
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja IV-1-2en IV-1-3 IV-1-4	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  電話番号 ファクシミリ番号	代理人 (agent)  平木 祐輔 HIRAKI, Yusuke 105-0001 日本国 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F Toranomon No.5 Mori Building Third Floor, 17-1, Toranomon 1-chome Minato-ku, Tokyo 105-0001 Japan 03-3503-8637 03-3503-0414
IV-2 IV-2-1ja IV-2-1en	その他の代理人  氏名 Name(s)	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 石井 貞次 ISHII, Sadaji
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	Designation of states EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	US


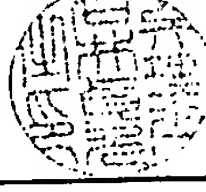
## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月29日（29.03.2000）水曜日 13時14分03秒

V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	Priority claim
VI-1-1	先の出願日	1999年10月08日 (08.10.1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-288677
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	照合欄	用紙の枚数
VIII-1	願書	4
VIII-2	明細書（配列表を除く）	23
VIII-3	請求の範囲	5
VIII-4	要約	1
VIII-5	図面	13
VIII-6	明細書の配列表	9
VIII-7	合計	55
VIII-8	添付書類 手数料計算用紙	添付 ✓
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト	別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面
VIII-17	その他	陳述書
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記録した書面
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	9
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月29日（29.03.2000）水曜日 13時14分03秒

IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名(姓名)	平木 祐輔
IX-2	提出者の記名押印	
IX-2-1	氏名(姓名)	石井 貞次

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## 特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

平木 祐輔

殿

PCT

あて名

〒 105-0001

東京都港区虎ノ門1丁目17番1号  
虎ノ門5森ビル3階

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
[PCT規則71.1]発送日  
(日.月.年)

28.08.01

出願人又は代理人  
の書類記号

PH-933-PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/01969

国際出願日

(日.月.年) 29.03.00

優先日

(日.月.年) 08.10.99

出願人（氏名又は名称）

独立行政法人産業技術総合研究所

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意  
出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。  
国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。  
この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。  
選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、独立行政法人工業所有権総合情報館（特許庁庁舎2階）で公報類の閲覧・複写および公報以外の文献複写等の取り扱いをしています。

#### 〔担当及び照会先〕

〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目4番3号（特許庁庁舎2階）

独立行政法人工業所有権総合情報館

【公報類】 閲覧部 TEL 03-3581-1101 内線3811～2

【公報以外】 資料部 TEL 03-3581-1101 内線3831～3

また、（財）日本特許情報機構でも取り扱いをしています。  
これらの引用文献の複写を請求する場合は下記の点に注意してください。

#### 〔申込方法〕

（1）特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

（2）公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

#### 〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

## P C T

## 国際予備審査報告


(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 PH-933-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01969	国際出願日 (日.月.年) 29.03.00	優先日 (日.月.年) 08.10.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15		
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人産業技術総合研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.04.01	国際予備審査報告を作成した日 15.08.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B 2936
	光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、  
出願時に提出されたもの  
PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、  
出願時に提出されたもの  
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	4, 9-18	有
請求の範囲	1-3, 5-8	無

進歩性(IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-18	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-18	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 11-127864, A (工業技術院長) 18.5月.1999 (18.05.99)

文献2: Nature Biotechnology, Vol.14, No.3, (1996), p.303-308

請求の範囲1-3, 5-8

請求の範囲1-3, 5-8に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献1により新規性を有さない。

文献1には、HIV-1 Tatタンパク質及びTat由来のペプチドに結合できるアプタマー(ミニ11G-31)が形成する二本鎖を、独立した二つのオリゴマーに分離し、該二つのオリゴマーをアニーリングすることによって、ミニ11G-31を模倣でき、Tat由来のペプチドと複合体を形成できることが記載されている。そして、文献1の第5図に示された二本のオリゴヌクレオチド鎖からなるアプタマーは、本願の構造式(II)及び(III)を有するものである。

したがって、請求の範囲1-3, 5-8に記載された発明は、文献1に記載された発明と区別できない。

請求の範囲4

請求の範囲4に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献1-2により進歩性を有さない。

文献2には、ステム構造を形成するアームの一方端に蛍光物質が、他方端にクエンチャー物質が結合されていると、ステム構造を形成しているときは、蛍光を発さないが、このステム構造よりも安定なハイブリッドが形成されると、構造変化によって、二つのアームが離れ、蛍光が発せられるようになるので、このことを利用して、特異的なハイブリッド形成を検出できることが記載されている。

してみると、文献1に記載された、二本のオリゴヌクレオチド鎖がハイブリッド形成してできるアプタマーを検出できるようにするために、ステム構造を形成する一方のオリゴヌクレオチドの両端にそれぞれ蛍光物質及びクエンチャー物質を結合することは、当該技術分野の専門家にとって自明なことである。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

請求の範囲 9-18

請求の範囲 9-18 に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献 1-2 により進歩性を有さない。

あるタンパクと特異的に結合する物質を利用して、該タンパクの存在や量を検出することは、当該技術分野の専門家の周知技術であるから、文献 1 に記載された Tat タンパク質及び Tat 由来のペプチドに結合できる二本のオリゴヌクレオチド鎖からなるアダプターを Tat タンパク質の検出に用いることは、当該技術分野の専門家にとって自明なことである。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 11-127864, A (Agency of Industrial Science and Technology), 18 May, 1999 (18.05.99), Par. No. 34; Fig. 5 (Family: none)	1-3, 5-7 4, 8-18
Y	Tyagi, S. et al. "Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization" Nature Biotechnology (1996) Vol.14, No.3, pp.303-308	4, 8-18
A	T. YAMAMOTO, et al., "Shinki Kakusan Iyakuhin; Peptide Iyakuhin no Shinkahou ni yoru Tansaku", Idenshi Igaku (1998) Vol.2, No.3, pp.375-380	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
16 June, 2000 (16.06.00)

Date of mailing of the international search report  
27 June, 2000 (27.06.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年4月19日 (19.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/27263 A1

(51) 国際特許分類:  
A61K 31/70, C12Q 1/68, G01N 33/15

C12N 15/11.

(71) 出願人 および

(72) 発明者: クマールペンメッチャ (KUMAR, Penmetcha) [IN/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木2-16-4 306-303 Ibaraki (JP). 山本利香 (YAMAMOTO, Rika) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮2-10-4 ニューハイツ木村203 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP00/01969

(22) 国際出願日:

2000年3月29日 (29.03.2000)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語:

日本語

(81) 指定国 (国内): US.

(30) 優先権データ:

特願平11/288677 1999年10月8日 (08.10.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

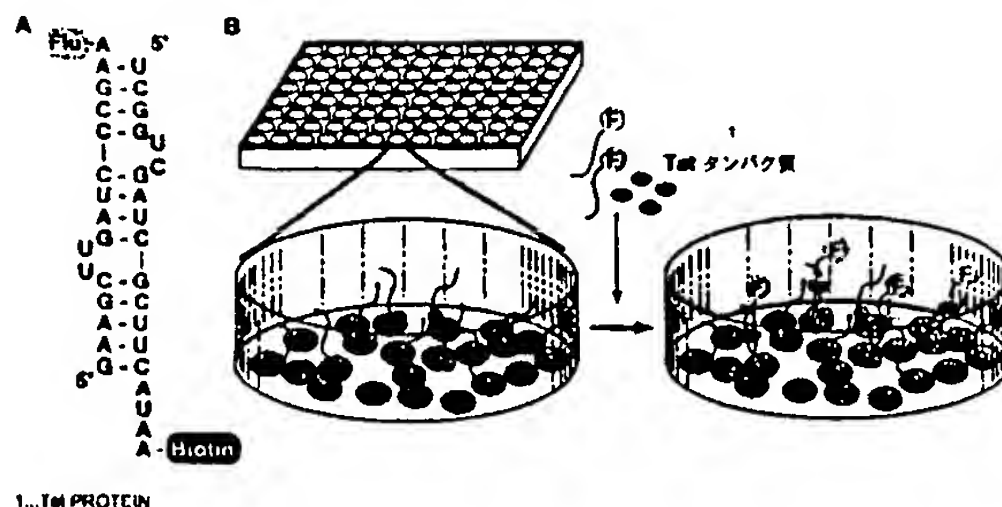
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODULATE APTAMER AND METHOD FOR DETECTING TARGET PROTEIN BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: モジューレートアプタマー及びこれを用いた標的タンパク質の検出方法



(57) Abstract: Attempts have been made to establish a novel strategy for providing an effective biosensor which is stabilized via the formation a conjugate exclusively in the presence of a target protein or a substance to be analyzed. A modulate aptamer binding specifically to a specific target protein, in particular, Tat protein of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), and a method and a

01/27263 A1



---

(57) 要約:

本発明は、標的タンパク質や解析物の存在下でのみ複合体が形成されて安定化し、効果的なバイオセンサーとして使用できる新しい戦略の開発を目的とする。

すなわち本発明は、特定の標的タンパク質、特にヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のTatタンパク質と特異的に結合するモジュレートアプタマー、及びこれを用いた標的タンパク質、特に HIV-1Tat タンパク質の検出方法並びに検出キッ



## 明 細 書

## モジュレートアプタマー及びこれを用いた標的タンパク質の検出方法

## 技術分野

本発明は、特定の標的タンパク質、特にヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の Tat タンパク質と特異的に結合するモジュレートアプタマー、及びこれを用いた標的タンパク質、特に HIV-1 Tat タンパク質の検出方法並びに検出キットに関する。

## 背景技術

核酸リガンド (アプタマー) の中には、タンパク質に対する親和性や特異性が、抗原に対する抗体の親和性・特異性に匹敵するものがあることが報告されており、これをバイオセンサーにおける分子認識因子として利用することが期待されている (Osborn, S. E. 及び Ellington, A. D., *Chem. Rev.* 97, 349-370 (1997))。このため、全長のアプタマーを用いて行った研究が奨励され、遂行された (Drolet, D. W., Moon-McDermott, L. 及び Roming, T. S. *Nature Biotechnol.* 14, 1021-1025 (1996); Kleinjung, F. ら, *Anal. Chem.* 70, 328-331 (1998); Potyrailo, R. A., Conrad, C. R., Ellington, A. D. 及び Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* 70, 3419-3425 (1998))。

更に、HIV-1 及び HIV-2 の Tat タンパク質に対して高い親和性を示すアプタマーは、感染細胞から放出された、または感染患者血清中の Tat タンパク質の量を測定することができるくらい感度が高いと考えられている (Westendrop, M. O. ら, *Nature* 375, 497-500 (1995); Pantaleo, G. ら, *Nature* 362, 355-358 (1993); Embretson, J. ら, *Nature* 362, 359-362 (1993))。

一方、最近、相補的な標的配列を見つけだすための道具として、モレキュラービーコンというステム・ループ構造を持つ核酸モチーフが開発された (Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996) *Nature Biotechnology* 14, 303-308)。このモレキュ

列の両端にある二つの相補的なアーム配列のアニールリングにより形成されるステム構造の二つの構造組成物を含むものである。ステム構造を形成する一方のアームの先端に一つの蛍光プローブが共有結合でつながっており、他方のアームの先端にクエンチャー物質が共有結合でつながっている。このビーコンのステム形成により蛍光プローブ及びクエンチャー物質は近接しており、そのために蛍光を発さない。このモレキュラービーコンが標的分子に出会うと、モレキュラービーコンのステム構造よりも安定なプローブ（ループ構造）・標的ハイブリッドが形成される。ステム・ループモチーフの構造変化により二つのアーム配列は引き離され、蛍光が発せられるようになる。従って、モレキュラービーコンを用いると、反応を中断することなくリアルタイムで特異的な核酸を検出する事ができ、また生きた細胞にも応用できることが報告されている（Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1998) *Nature Biotechnology* 16, 49-53; Matsuo, T. (1998) *Biochem. Biophys. Acta.* 1379, 178-184; Sokol, D.L., Zhang, X., Lu, P. and Gewirtz, A.M. (1998) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11538-11543）。

しかしながら、上記の最初に行われたアプローチにはいくつかの制限があった。例えば、アプタマーの長さが長くなるほど化学合成の効率が下がること、ヌクレアーゼに対して全長アプタマーの保護が必要であること、複数の解析の場合、長いアプタマーでは構造化、再構造化の効率が比較的低いことなどである。

すなわち、アプタマーのサイズや認識様式が理由で、アプタマーをバイオセンサーを用いた実験に応用するのには限界があった。

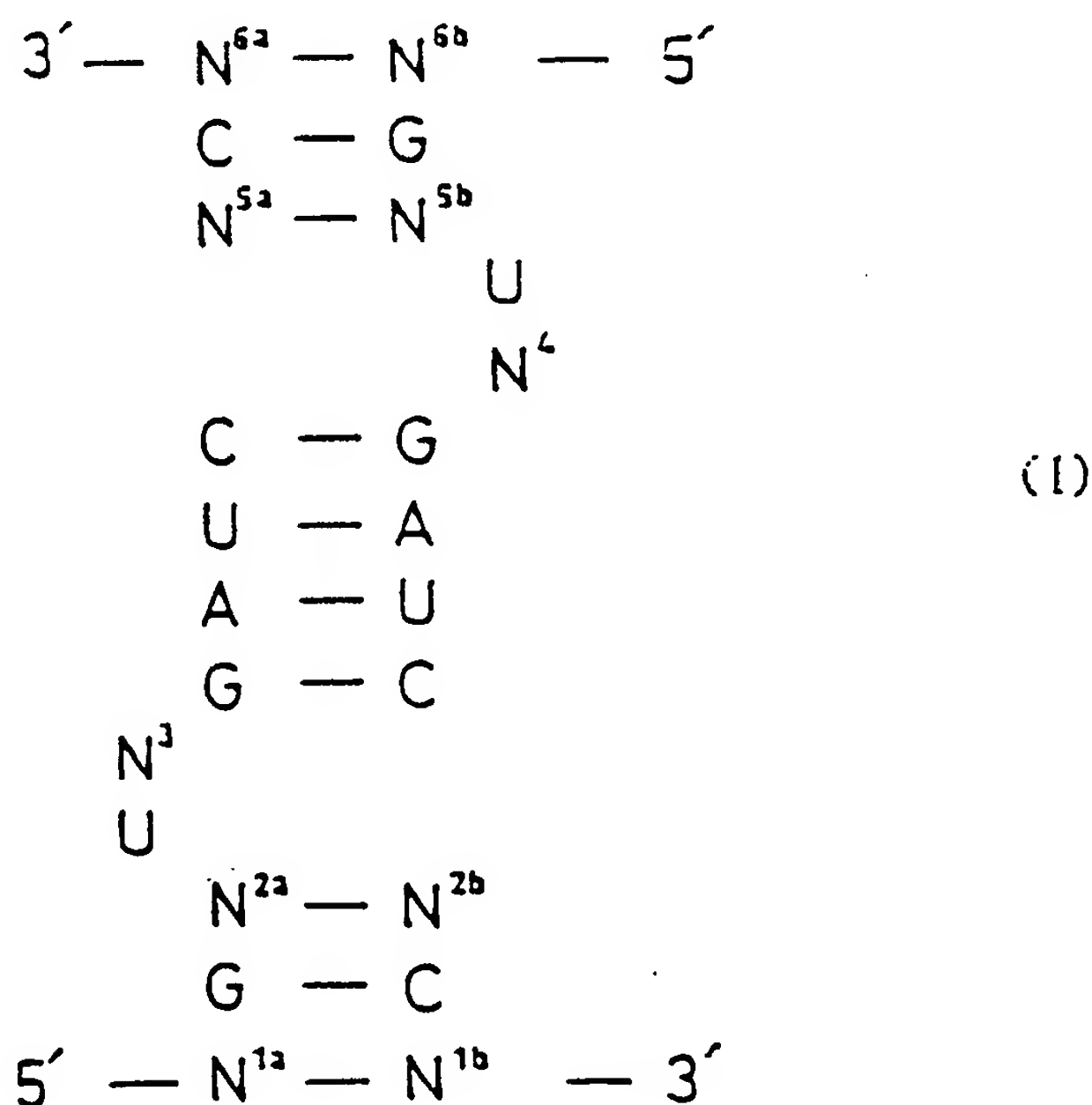
## 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決し、標的タンパク質や解析物の存在下でのみ複合体が形成されて安定化し、効果的なバイオセンサーとして使用できる新しい戦略を開発した。具体的には、先に出願した HIV-1 Tat タンパク質のアプタマーRNA（特開平11-127864号）に基づき、アプタマー配列を独立した二本鎖に分けて、Tat タンパク質の検出により効果的なモジュレートアプタマーを構築した。

nM 以下の HIV-1 Tat タンパク質または Tat 由来ペプチドの存在下で複合体を形成するが、他の RNA 結合タンパク質や核抽出物の存在下では複合体を形成しないことが見出された。

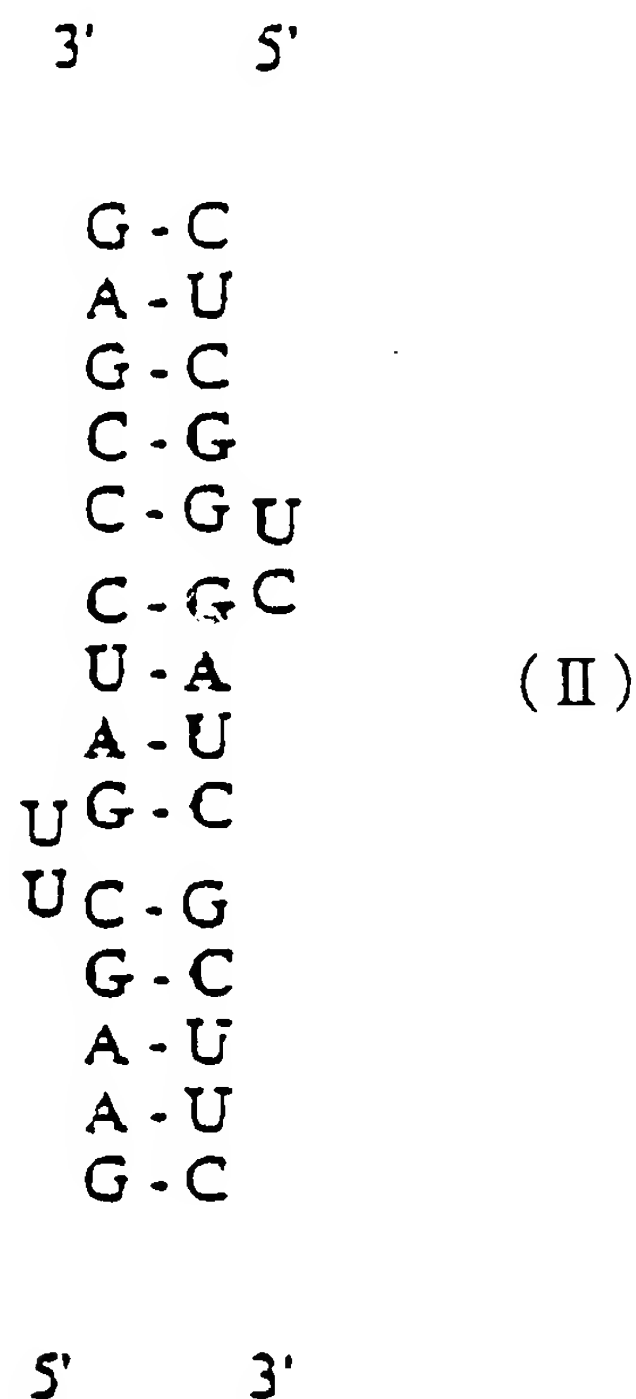
すなわち、本発明は、相補的な二本のオリゴヌクレオチド鎖から構成されるアプタマーであって、標的タンパク質の存在下においてのみ複合体を形成し、安定化することを特徴とするモジュレートアプタマー、特に標的タンパク質が HIV-1 Tat タンパク質及び／またはその断片であることを特徴とするモジュレートアプタマーに関する。

本発明のモジュレートアプタマーの一例として、下記の二次構造 (I) によって表されるヌクレオチド配列を有するモジュレートアプタマーを挙げることができる。



(構造中、 $N^{1a}$  及び  $N^{1b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{2a}$  及び  $N^{2b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^3$  及び  $N^4$  はそれぞれ独立に 1 または 2 個の核酸塩基であり、 $N^{5a}$  及び  $N^{5b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{6a}$  及び  $N^{6b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、そして実線は核酸塩基間の水

本発明において特に好ましいモジュレートアプタマーとしては、下記の二次構造 (II) によって表されるヌクレオチド配列を有するモジュレートアプタマーを挙げることができる。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

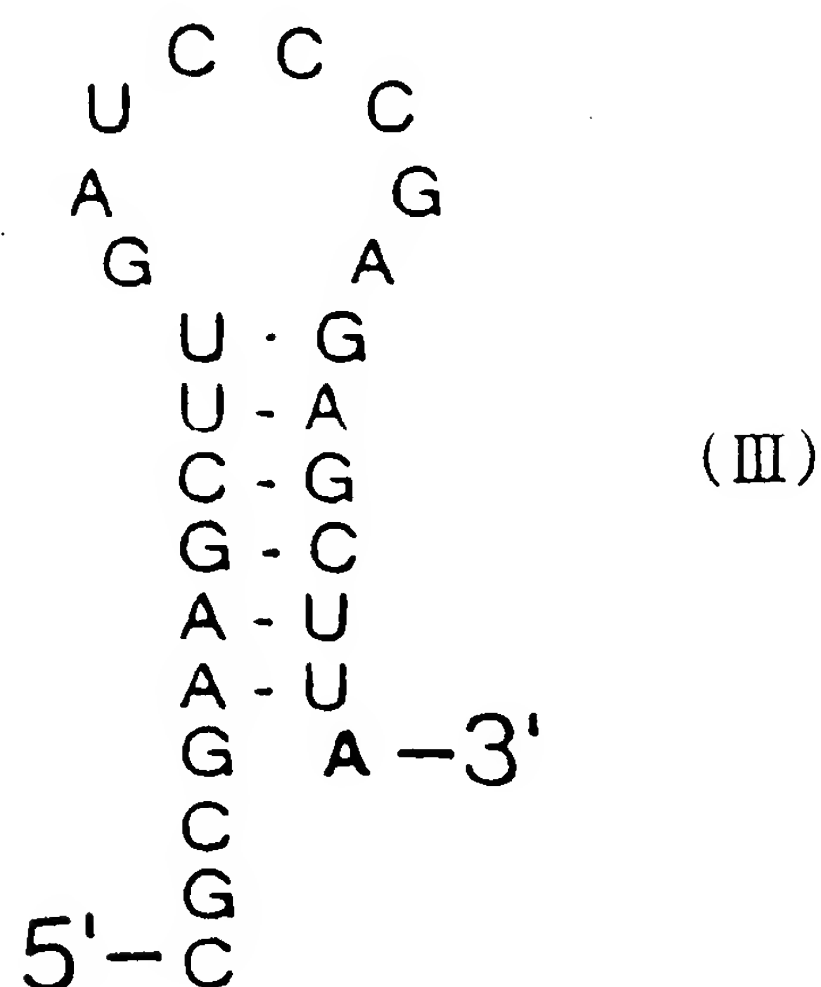
また、上記モジュレートアプタマーを用いて、HIV-1 Tat タンパク質等の標的タンパク質を検出できる簡便で高感度の検出方法、具体的には蛍光を用いたマイクロタイタープレートアッセイを開発した。このアッセイは DNA アレイと同様に利用できる可能性があり、ウイルスタンパク質や他の小分子物質の検出に取り入れ、拡張することができると考えられる。

本発明は更に、その一態様として、モジュレートアプタマーを構成する一方のオリゴヌクレオチド鎖が分子内に互いに相補的な 4 個以上の連続ヌクレオチド配列を有し、標的タンパク質の非存在下ではステム・ループ構造であることを特徴とする上記のモジュレートアプタマーを提供する。

具体的には、例えば、上記ステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖の 5' または 3' 末端に蛍光物質を、3' または 5' 末端に該蛍光物質に対するクエンチャー物質を結合させ、標的タンパク質の存在下においてのみ複合体を形成し、

蛍光を発するようにすると検出が非常に容易になる。

このステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖の好ましいものとして、下記の二次構造(III)によって表されるヌクレオチド配列を有するものが挙げられる。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

この「モジュレートアプタマー」の新しい戦略は、様々な分子に対して分子認識因子を特徴づけるバイオセンサーに容易に応用できる。

従って、本発明はまた、上記のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖を放射性又は非放射性標識し、標的タンパク質の存在下で形成した複合体の有無及び／または量によって標的タンパク質の存在及び／または量を検出することを特徴とする、標的タンパク質、特に HIV-1Tat タンパク質及び／またはその断片の検出方法を提供する。

本発明の方法の一態様において、前記非放射性標識はフルオレセインであり、その蛍光シグナルによって前記複合体を検出する。

また、本発明は、上記のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖を支持体上に固定化し、放射性又は非放射性標識した他方のオリゴヌクレオチド鎖の添加によって形成した複合体の有無及び／または量によって標的タンパク質の存在及び／または量を検出することを特徴とする、標的タンパク質、特に HIV-1Tat タンパク質及び／またはその断片の検出方法を提供する。

本発明の方法の一態様において、前記非放射性標識はフルオレセインであり、その蛍光シグナルによって前記複合体を検出する。

ビジン及びビオチンの特異的結合による。

本発明は更に、支持体、支持体上に固定化される上記のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖、標的タンパク質の存在下で複合体を形成する他方のオリゴヌクレオチド鎖を含んでなることを特徴とする、標的タンパク質、特に HIV-1 Tat タンパク質及び／またはその断片の検出キットを提供する。

本発明のキットにおいて、具体的には、上記モジュレートアプタマーの 5'-鎖（図 2 における左側の鎖）または 3'-鎖（図 2 における右側の鎖）を前記一方のオリゴヌクレオチド鎖とし、3'-鎖または 5'-鎖を前記他方のオリゴヌクレオチド鎖とする。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国平成 11 年特許願第 288677 号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、アプタマー RNA<sup>Tat</sup>、TAR-1 RNA (59mer) 及び TAR-2 RNA (123mer) の二次構造を示す図である。実線で囲まれた部分は Tat 結合に必要なコア因子を示す。

図 2 は、本発明のモジュレートアプタマー RNA (i、DA-1/DA-2; ii、DA-3/DA-4; iii、DA-5/DA-6; iv、DA-7/DA-8、v、DA-1/DA-4) の二次構造を示す図である。

図 3 は、様々なモジュレートアプタマー RNA のオートラジオグラムを示す図である。レーン 1、放射標識 5'-オリゴ (10 nM) のみ；レーン 2、放射標識 5'-オリゴ (10 nM) 及び非標識 3'-オリゴ (200 nM)；レーン 3、20 nM CQ 存在下での放射標識 5'-オリゴ (10 nM) 及び非標識 3'-オリゴ (200 nM)；レーン 4、200 nM Tat-1 存在下での放射標識 5'-オリゴ (10 nM) 及び非標識 3'-オリゴ (200 nM)。太い矢印は、モジュレートアプタマー RNA-Tat またはモジュレートアプタマー RNA-CQ 複合体の位置を示す。遊離 5'-オリゴヌクレオチドの位置は細い矢印で示す。

図 4 は、モジュレートアプタマー DA-1/DA-2 と CQ の結合解析ゲルシフトアッセ



と Scatchard プロットを示す図である。太い矢印と細い矢印はそれぞれモジュレートアプタマー-RNA-CQ 複合体と遊離 5'-オリゴヌクレオチドの位置を示す。

図 5 は、モジュレートアプタマー-DA-5/DA-6 と CQ の結合解析ゲルシフトアッセイのオートラジオグラム、及びモジュレートアプタマー-DA-5/DA-6-CQ の飽和曲線と Scatchard プロットを示す図である。太い矢印と細い矢印はそれぞれモジュレートアプタマー-RNA-CQ 複合体と遊離 5'-オリゴヌクレオチドの位置を示す。

図 6 は、不活性型モジュレートアプタマー (DA-5i/DA-6i) の二次構造 (A) 及びこれと CQ ペプチドとの結合のゲルシフトアッセイによる解析のオートラジオグラム (B) を示す図である。レーン 1、放射標識 5'-オリゴ (10 nM)；レーン 2、放射標識 5'-オリゴ (10 nM) と、非標識 3'-オリゴ (200 nM)；レーン 3、20 nM CQ 存在下での放射標識 5'-オリゴ (10 nM) と、非標識 3'-オリゴ (200 nM)。

図 7 は、二重鎖 TAR RNA (ii、DT-1/DT-2) の二次構造及びこれと CQ ペプチドとの結合のゲルシフトアッセイによる解析のオートラジオグラム (B) を示す図である。レーン 1、放射標識 5'-オリゴ (10 nM)；レーン 2、放射標識 5'-オリゴ (10 nM) と、非標識 3'-オリゴ (200 nM)；レーン 3、20 nM CQ 存在下での放射標識 5'-オリゴ (10 nM) と、非標識 3'-オリゴ (200 nM)。

図 8 は、モジュレートアプタマー-DA-5/DA-6 と Tat 由来ペプチド (CQ、RE、CP) との結合のゲルシフトアッセイのオートラジオグラムを示す図である。太い矢印と細い矢印はそれぞれモジュレートアプタマー-RNA-CQ 複合体と遊離 5'-オリゴヌクレオチドの位置を示す。

図 9 は、解析物依存型結合オリゴヌクレオチドアッセイ (ADHONA) を示す図である。ADHONA に用いたモジュレートアプタマー-DA-9/DA-10 の二次構造 (A) 及び ADHONA の機構 (B)

図 10 は、ADHONA の CQ ペプチド濃度依存性：CQ ペプチド非存在下 (対照) または CQ ペプチド存在下 (10、50、100 pmol) での蛍光シグナル強度を示す図である。結果は 3 回の実験の平均値 (±標準偏差) を示す。

図 11 は、Tat-1 ペプチドを用いた ADHONA の結果を示す図である。Tat-1 または CQ ペプチド非存在下での蛍光シグナル強度 (対照)；10 pmol CQ ペプチド存在

結果は3回の実験の平均値（±標準偏差）を示す。

図12は、HeLa核抽出物の共存によるADHONAに対する影響を示す図である。Tat-1またはCQペプチド非存在下での蛍光シグナル強度（対照）；8ユニットのHeLa核抽出物存在下での蛍光シグナル強度（1）；10 pmol CQ存在下での蛍光シグナル強度（2）。結果は3回の実験の平均値（±標準偏差）を示す。

図13は、5'末端にフルオレセイン、3'末端にDABCYLを結合させたステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖DA13(C-A)の二次構造、本発明のモジュレートアプタマーRNAであるDA13(C-A)/DA6の二次構造、及びDA13(C-A)と完全に相補的なDA13Cとの塩基対形成を示す図である。

図14は、モレキュラービーコンアプタマーを用いたCQの蛍光による検出を示す図、及びその際のオリゴヌクレオチド鎖の二次構造の模式図である。10nM DA13(C-A)のみ（対照）；10nM DA13(C-A) + 100nM DA6 (CQ-)；10nM DA13(C-A) + 100nM DA6 + 100nM CQペプチド (CQ+)；10nM DA13(C-A) + 100nM DA13C (DA13C)。

図15は、図14と同じ条件のサンプルCQ-、CQ+及びDA13Cの蛍光強度をFluorImager (Molecular Dynamics) で測定した図である。結果は3回の実験の平均値（±標準偏差）を示す。

#### 配列表の説明

配列番号1：HIV-1 Tat タンパク質に対するアプタマーRNA

配列番号7：モジュレートアプタマーの5'側オリゴヌクレオチド

配列番号8：モジュレートアプタマーの5'側オリゴヌクレオチド

配列番号9：モジュレートアプタマーの5'側オリゴヌクレオチド

配列番号10：モジュレートアプタマーの5'側オリゴヌクレオチド

配列番号11：モジュレートアプタマーの3'側オリゴヌクレオチド

配列番号12：モジュレートアプタマーの3'側オリゴヌクレオチド

配列番号13：モジュレートアプタマーの3'側オリゴヌクレオチド

配列番号14：モジュレートアプタマーの3'側オリゴヌクレオチド

配列番号15：改変した5'側ヌクレオチド

配列番号16：改変した3'側ヌクレオチド

配列番号 17 : 改変した 5' 側ヌクレオチド

配列番号 18 : モジュレートアプタマーの 5' 側オリゴヌクレオチド

配列番号 19 : モジュレートアプタマーの 3' 側オリゴヌクレオチド

配列番号 20 : モレキュラービーコンアプタマー

配列番号 21 : モレキュラービーコンアプタマーに相補的なオリゴヌクレオチド

### 発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、「アプタマー」とは、ある標的タンパク質に特異的に強く結合するように人工的に創製された核酸リガンドをいい、「モジュレートアプタマー」とは、アプタマーのコアの部分を、 $T_m$  値の低い、短い二本鎖オリゴヌクレオチドに分け、標的タンパク質の存在下でのみ安定に二本鎖を組むように設計されたものをいう。「モレキュラービーコンアプタマー」は、標的配列に相補的なプローブとなるループ配列と、プローブ配列の両端にある二つの相補的なアーム配列のアニリングにより形成されるステム構造の二つの構造組成物を含むものである。

また、本発明において、「相補的」及び「相補的塩基対形成」とは、核酸の塩基がアデニンとウラシル、グアニンとシトシンの間で水素結合により対合することをいう。相補的塩基対形成が可能な核酸塩基対としては、アデニンとウラシル、グアニンとシトシンの組み合わせを挙げることができる。

「複合体」とは、本発明の二本鎖モジュレートアプタマー及び標的タンパク質から構成され、水素結合、疎水的相互作用等の非共有結合によって結合し、安定化状態にあるものをいう。ここで、安定化とは、結合・解離の平衡状態が、より結合の状態に偏り、解離しにくい複合体を形成することをいう。

「放射性標識」とは、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等の放射性同位元素を含有する物質を使用して標識することをいい、「非放射性標識」とは、放射性物質を使用せずに標識することをいう。非放射性標識において、標識物質としては具体的には発光分子、フルオレセイン等の蛍光分子、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等の酵素、抗体、ビオチン等の特定の分子と結合性を有する分子等の当該分野で用いられているものが挙げられ、特に限定されない。

「支持体」とは、本発明の検出方法及び検出キットにおいて、複合体形成反応を固定位置で行うために使用するものをいい、ガラス、プラスチック等の吸光を示さないものであればいずれでも良いが、反応液が微量の本発明のアッセイにおいてはマイクロタイタープレート等が特に好ましい。

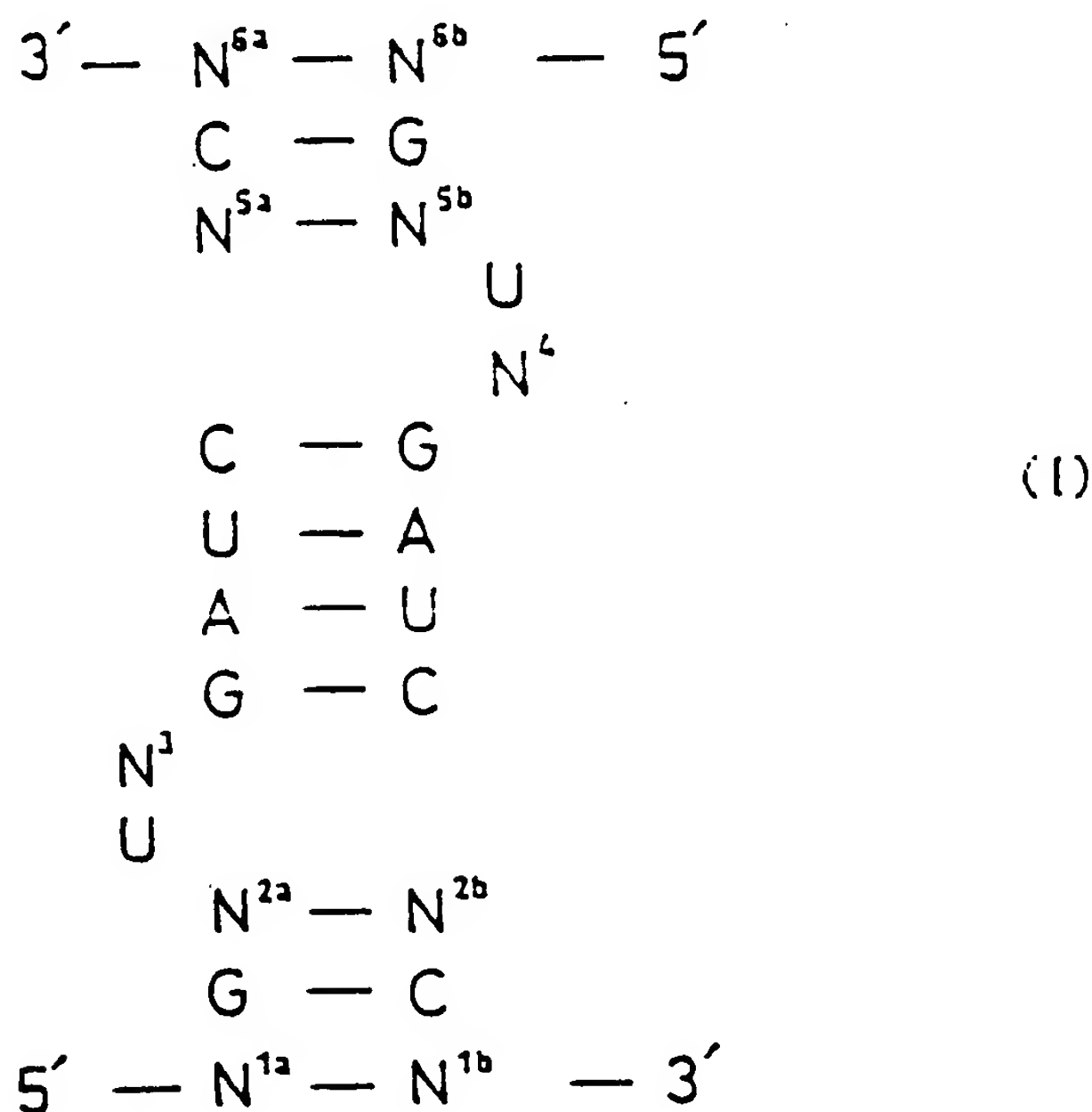
「標的タンパク質」とは、本発明のモジュレートアプタマーが高い親和性及び特異性をもって結合して安定化し、その存在及び／または量を検出できるタンパク質またはペプチドをいい、例えば HIV-1 Tat 及びアミノ酸鎖長が約 40 のその断片、CQ ペプチド、RE ペプチド等、HIV Rev タンパク質等が挙げられる。また、HIV として HIV-1 及び HIV-2 が知られているが、本明細書において、Tat-1、TAR-1 とは、それぞれ HIV-1 の Tat (トランス活性化因子) タンパク質及び TAR (トランス活性化応答領域) をいい、Tat-2、TAR-2 とは、それぞれ HIV-2 の Tat タンパク質及び TAR をいう。

本発明者らは先に、HIV-1 の TAR (図 1 中央) よりも高い特異性及び親和性で HIV-1 Tat タンパク質に結合するアプタマー RNA<sup>Tat</sup> (図 1 左、配列番号 1) を単離し、HIV が関与する疾病を診断、予防及び治療するための医薬組成物におけるその利用についても報告した (Yamamoto, R., Murakami, K., Taira, K. 及び Kumar, P. K. R., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 451-466 (1998)、特開平 11-127864 号)。このアプタマーは Tat タンパク質に対して高い親和性 (Tat-1 に対する K<sub>d</sub> 値は TAR-1 RNA (59 mer、図 1 中央、配列番号 2) よりも 100 倍低く、Tat-2 に対する K<sub>d</sub> 値は TAR-2 RNA (123 mer、図 1 右、配列番号 3) よりも 40 倍低い) を有し、また、アプタマーのループ部分の配列は Tat タンパク質結合部位ではないため、アプタマーを二本鎖に分割することが可能である。

この観点から、本発明者らは Tat-1 タンパク質に対するコア結合因子 (図 1 において実線で囲まれた部分) を含む、異なる長さのいくつかのモジュレートアプタマーオリゴヌクレオチドを合成した。

すなわち、まず本発明のモジュレートアプタマーの 5'-側に相当するオリゴヌクレオチド鎖及び 3'-側に相当するオリゴヌクレオチド鎖をそれぞれ化学合成した。使用に際しては、相補的な二本のオリゴヌクレオチド鎖の一方または双方を、先に定義したように検出可能に放射性又は非放射性標識して使用できる。

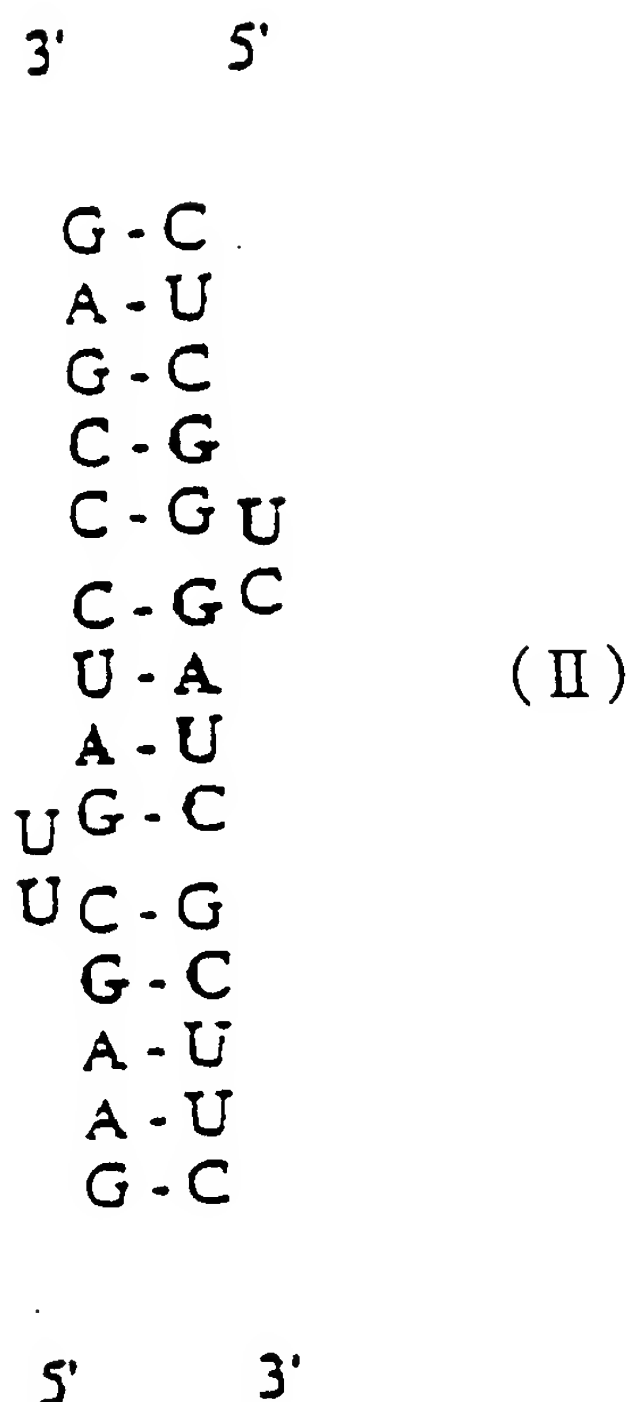
本発明のモジュレートアプタマーは、標的タンパク質の存在下で上記オリゴヌクレオチド鎖から再構成されるものであり、好ましいものとしては下記の二次構造 (I) によって表されるものが挙げられる。



(構造中、 $N^{1a}$  及び  $N^{1b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{2a}$  及び  $N^{2b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^3$  及び  $N^4$  はそれぞれ独立に 1 または 2 個の核酸塩基であり、 $N^{5a}$  及び  $N^{5b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{6a}$  及び  $N^{6b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、そして実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

上記二次構造 (I) で表される本発明のモジュレートアプタマーは、TAR-1 RNA のコア因子が逆向きに並んだ繰り返しにより HIV-1 Tat タンパク質に対して高い親和性を示し、配列特異的に Tat-1 タンパク質または CQ 等の Tat-由来ペプチドに結合する。また、相補的塩基対形成から飛び出したバルジ残基の存在が HIV-1 Tat タンパク質の認識及び効率的な結合に必須であることも明らかとなった。

また、本発明において特に好ましいモジュレートアプタマーとして、下記の二次構造 (II) によって表されるヌクレオチド配列を有するものが挙げられる。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

一方、以前の生化学的実験から、HIV-1 Tat タンパク質において、RNA 認識及び結合に必要な最小限の領域がわかっている。CQ ペプチドと呼ばれるこのペプチド領域は 37-72 アミノ酸残基からなり (配列番号 4)、TAR-1 RNA に全長の Tat-1 タンパク質と同等の効率で結合する (Weeks, K. M., Ampe, C., Schultz, S. C., Steitz, T. A. 及び Crothers, D. M., *Science* 249, 1281-1285 (1990); Calnan, B. J., Biancalnan, S., Hudson, D. 及び Frankel, A. D., *Genes Dev.* 5, 201-210 (1991))。このことから、モジュレートアプタマーの能力を調べる実験では、標的タンパク質として Tat-1 タンパク質または CQ 等の Tat-由来ペプチドを用いて行った。また、Tat-1 ペプチド由来の他のペプチドとして RE (配列番号 5)、Tat-2 由来ペプチド CP (配列番号 6) も使用した。

また、本発明において、標的タンパク質の存在下でのみ複合体を形成するモジュレートアプタマーRNAを用いた標的タンパク質の新規検出方法を提供する。この方法は、特に HIV-1 Tat タンパク質を標的としたモジュレートアプタマーを用いて解析した。本発明のモジュレートアプタマーは Tat タンパク質の存在下で効率よく複合体を形成し、他の RNA 結合タンパク質の存在下では複合体を形成しな



い。従って、Tal タンパク質の存在及び量をモジュレートアプタマーを用いて測定できる。

本発明の一態様として、本発明のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖を先に定義した放射性標識し、他方のオリゴヌクレオチド鎖及び標的タンパク質の存在下で複合体を形成させ、該複合体形成の有無及び／または量を検出する。複合体形成反応の条件は、例えば pH 7～8 のトリスバッファー中で、30℃、30分であるが、当業者であれば、反応温度、反応時間、反応液の組成等の条件を適宜変更することができる。

複合体形成後、複合体の形成を直接検出することも可能であるが、場合により、電気泳動等の当該分野で通常用いられる方法によって形成した複合体を分離することもできる。

前記放射性標識の代わりに非放射性標識を使用しても良く、例えばフルオレセインを使用した場合には、その蛍光シグナルによって検出することができる。

本発明の方法の別の態様においては、一方のオリゴヌクレオチド鎖を先に定義した支持体上に固定化し、放射性または非放射性標識した他方の鎖の添加によって標的タンパク質の存在下で形成した複合体を検出する。この場合、複合体形成反応の後、必要により、検出前に複合体を形成していないオリゴヌクレオチド等を洗浄によって除去する。固定化は、当該分野で通常行われるものであればいずれでも良く、物理的手段、化学的手段等、特に限定するものではないが、アビジンまたはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用するのが好ましい。

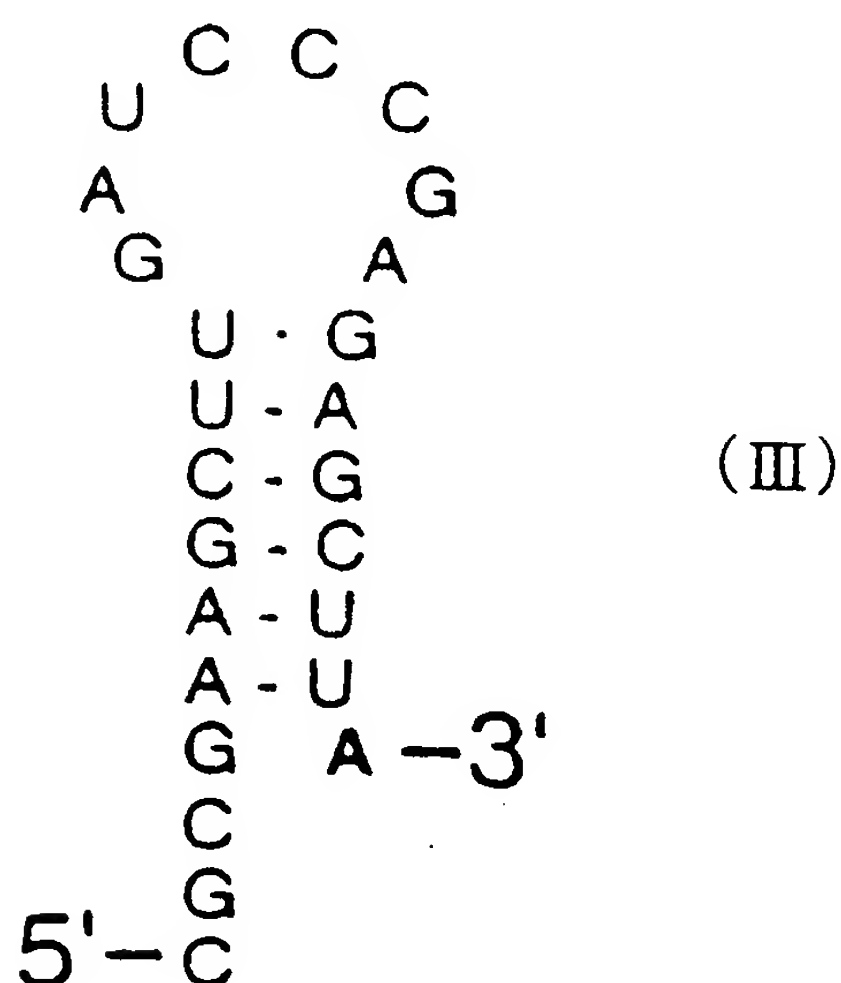
また本発明は、上記支持体、支持体上に固定化される本発明のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖、標的タンパク質の存在下で複合体を形成する、放射性または非放射性標識された他方のオリゴヌクレオチド鎖を含む、標的タンパク質の検出キットを提供する。支持体上への固定化は、使用時に行うようにしても良いが、予め固定化したものをキットとして提供しても良い。上記と同様、固定化は、当該分野で通常行われるものであればいずれでも良く、特に限定するものではないが、アビジンまたはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用するのが好ましい。

ンプル中でも保たれ、感染細胞中等においても、直接本発明の検出方法が使用できる。

本発明によって、アプタマー由来のオリゴヌクレオチドの安定な二重鎖構造の形成を、標的タンパク質の存在下で効率よく調節できたことから、これを利用して、本発明において、初めてモレキュラービーコンアプタマーを利用した標的タンパク質、特に Tat タンパク質またはその断片の検出法を提供する。

本発明において使用されるモレキュラービーコンアプタマーは、上記のモジュレートアプタマーの一態様において使用され、このモジュレートアプタマーを構成する一方のオリゴヌクレオチド鎖が互いに相補的な 4 個以上の連続ヌクレオチド配列を有し、標的タンパク質の非存在下ではステム・ループ構造であることを特徴とする。互いに相補的な配列が 3 個以下では、安定なステム・ループ構造をとることができないので好ましくない。

このステム・ループ構造の一例として、下記の二次構造 (III) によって表されるヌクレオチド配列を有するものが挙げられる。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

本発明においてモレキュラービーコンアプタマーを使用する際は、ステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖の 5' または 3' 末端に蛍光物質を、3' または 5' 末端に該蛍光物質に対するクエンチャー物質を結合させる。

具体的には、モジュレートアプタマーの配列に基づいて アプタマーを構成す

る一方のオリゴヌクレオチド鎖、すなわちステム・ループ構造をとる配列の 5' 末端に [4'-(4'-ジメチル-アミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABSYL)] 等のクエンチャー物質、3' 末端にフルオレセイン、クマリン、テトラメチルローダミン等の蛍光物質を共有結合でつなぎ、モレキュラービーコンアプタマーを構築する (図 13 左)。対照として、このモレキュラービーコンアプタマーと完全に相補的な配列を持つ RNA オリゴヌクレオチドを合成し、蛍光物質とクエンチャー物質間の距離が離れたときの蛍光強度の相対的な量を評価するのに用いる。

モジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチドを構成する DA-13 (C-A) (図 13 左) は、プローブ (モジュレートアプタマーの他方の鎖) と標的タンパク質の双方が存在するときのみにステム・ループ構造から二重鎖構造への構造変化が起こり、プローブまたは標的タンパク質の非存在下では、この構造変化は起こらない。従って、本発明において、モレキュラービーコンは標的タンパク質の存在により構造変化し、これを効率よく検出できる。

上記モレキュラービーコンアプタマーはこれまで記載したモジュレートアプタマーの一態様であって、これを使用して、先に記載した標的タンパク質の検出方法及び検出キットが同様に好適に提供されることは理解されるであろう。

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

## 実施例 1

### Tat 由来ペプチド、アプタマー、及びモジュレートアプタマーの合成

Tat-1 由来ペプチド CQ (37~72 アミノ酸; 配列番号 4)、RE (49~86 アミノ酸; 配列番号 5)、Tat-2 由来ペプチド CP (66~97 アミノ酸; 配列番号 6) はいずれも TANA Lab. L.C. (Texas, USA) に化学合成を依頼した。

図 1 に示したアプタマー-RNA<sup>Tat</sup> オリゴヌクレオチド (アプタマー-RNA、配列番号 1) は、フォスフォロアミダイト (Glen Corporation、アメリカ) を用いて、RNA/DNA 合成機 (Applied Biosystem モデル 394) で合成した後、本発明者らが記載した公知の方法で脱保護、精製した (Yamamoto, R., Murakami, K., Taira, K. 及 7K Kumar, P. K. R., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 451-466 (1998))。

一方、本発明のモジュレートアプタマーの 5'-側に相当するオリゴヌクレオチド鎖 (DA-1、DA-3、DA-5、及び DA-7、それぞれ配列番号 7、8、9、及び 10)、及び 3'-側に相当するオリゴヌクレオチド鎖 (DA-2、DA-4、DA-6、及び DA-8、それぞれ配列番号 11、12、13、及び 14) をそれぞれ上記アプタマー RNA と同様に化学合成し、脱保護した。モジュレート RNA の 5'-鎖は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 標識した。

## 実施例 2

### ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイを用いて、5 種のモジュレートアプタマーの複合体形成について調べた。

RNA オリゴヌクレオチドによる二重鎖形成は、先に報告した手法 (Yamamoto, R., Murakami, K., Taira, K. 及び Kumar, P. K. R., *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 451-466 (1998)) で、Tat または Tat 由来のペプチド、CQ、RE、CP 存在下で解析した。

5 種の二重鎖を形成する可能性のある 8 本の RNA オリゴヌクレオチドを解析した (図 2)。全ての場合において、二重鎖アプタマー RNA の 5'-鎖 (DA-1、DA-3、DA-5、DA-7、それぞれ配列番号 7、8、9、及び 10) を  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP で標識した。10  $\mu\text{l}$  Tat 結合バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 70 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01% Nonidet P-40) 中、40 nM 大腸菌 tRNA の存在下で、5'-末端標識した RNA (2 kcpm) と 200 nM の標識していない相補鎖 RNA (DA-1 に対して DA-2 または DA-4、DA-3 に対して DA-4、DA-5 に対して DA-6、DA-7 に対して DA-8) を混合した。

これに 20 nM CQ ペプチドまたは 200 nM Tat タンパク質を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間放置した。反応産物は非変性ポリアクリルアミドゲル (15%) 上で分離し、タンパク質またはペプチドの存在下及び非存在下での複合体の形成量をイメージアナライザーで測定した (BAS2000、フジフィルム、日本)。

結果を図 3 に示す。5 種のオリゴヌクレオチド対のうち 4 つ、DA-1/DA-2、DA-3/DA-4、DA-5/DA-6、DA-1/DA-4 (図 2 及び図 3 中それぞれ i、ii、iii、v) は、Tat タンパク質 (200 nM、レーン 4) または Tat 由来ペプチド CQ (20 nM、レーン 3) の存在下では高い親和性で複合体を形成したが、Tat タンパク質の非存在下 (レ

ーン 2) では複合体を形成しなかった。特に DA-5/DA-6 オリゴヌクレオチドは Tat タンパク質または CQ ペプチドの存在下で他のモジュレートアプタマーよりも効率よく複合体を形成し、Tat との複合体は 50%、CQ との複合体は 84%であった (図 3 iii)。

### 実施例 3

#### 反応速度論的解析

実施例 1 で得られたモジュレートアプタマー RNA オリゴヌクレオチド DA-1/DA-2 (図 2 i) 及び DA-5/DA-6 (図 2 iii) と CQ ペプチドとの複合体の平衡解離定数 ( $K_d$ ) 値を、様々な濃度の CQ (それぞれ 0.1~12.8 nM、2~64 nM) の存在下でゲルシフトアッセイを行って解析した。

5' -末端標識 RNA (50 pM) DA-1 または DA-5 とその相補鎖 RNA を 10  $\mu$ l Tat 結合バッファー中で混合し、40 nM tRNA を非特異的競合剤として加えた。CQ ペプチド (0.5~64 nM) を加え、30℃で 1 時間放置した。反応産物を非変性ポリアクリルアミドゲル (15%) 上で分離し、解析した。下記の結合方程式から  $B_{max}$  と  $K_d$  を求めた。

$$Y = B_{max} \cdot X / K_d + X$$

Y : 特異的な結合、 $B_{max}$  : 最大の結合、X : リガンドの濃度

Graphpad PRISM ソフト (Graphpad Software Inc、アメリカ) を用いて、非直線退行解析を行った。

図 4 及び 5 に示す結果から明らかなように、DA-5/DA-6-CQ、DA-1/DA-2-CQ 複合体の  $K_d$  値はそれぞれ 0.5 nM と 400 nM であり、DA-1/DA-2-CQ 複合体の  $K_d$  値は DA-5/DA-6-CQ 複合体の  $K_d$  値よりも 800 倍高かった。この違いは主として、DA-5/DA-6-CQ 複合体における分子の両端にある二つの付加 G-C 塩基対の形成に起因すると考えられる。

他の Tat ペプチドにおいても同様の結果が得られ、モジュレートアプタマーは Tat または CQ ペプチドの存在下で RNA 二本鎖を再構成し、その Tat タンパク質に対する親和性や特異性はヘアピンアプタマー RNA<sup>Tat</sup> (図 1 左) に匹敵することが示された。

## 実施例 4

コア因子変異体との比較 1

DA-5/DA-6-CQ 複合体の  $K_d$  値はヘアピンアプタマー-RNA<sup>Tat</sup> の  $K_d$  値と近似していることから、モジュレートアプタマー、特に DA-5/DA-6 は Tat タンパク質または CQ ペプチドの存在下で結合コア因子を再構成すると考えられる。アプタマー-RNA<sup>Tat</sup> の Tat タンパク質結合に必要な結合コア因子は、中央の 4 塩基対のヘリックスとその両側の 2 残基ずつを含む二つのバルジからなり、部位特異的変異実験より両方のバルジの U 残基が Tat タンパク質との結合のために大変重要であることがわかっている。従って、ヘアピンアプタマーとモジュレートアプタマーオリゴヌクレオチド DA-5/DA-6 の反応速度論的解析から、RNA 組成物、DA-5 と DA-6 の両方の鎖が Tat タンパク質と相互作用していると推測される。

このことを確かめるために、DA-5 と DA-6 の C 残基を U 残基に置換した変異体 (DA-5i/DA-6i (配列番号 15 / 16)、DA-5i は  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP で標識した) を合成し (図 6 A)、実施例 2 と同様にして複合体形成能を調べた。CQ ペプチドを用いて行った結果を図 6 B に示す。図 6 B の結果から明らかな如く、このオリゴヌクレオチド対 (DA-5i/DA-6i) は複合体を形成することはできなかった。この結果は、ヘアピンアプタマーの Tat-1 への結合に重要な官能基 (例えば、U 残基の 3 位の窒素) が、モジュレートアプタマー-DA-5/DA-6 の Tat-1 への結合にも重要であることを示している。

## 実施例 5

コア因子変異体との比較 2

TAR-1 RNA 由来の RNA オリゴヌクレオチド、DT-1/DT-2 (図 7 A、DT-1 は配列番号 17) についても、実施例 2 と同様にして Tat-1 タンパク質または CQ ペプチドとの結合を DA-5/DA-6 と比較した。CQ ペプチドを用いて行った結果を図 7 B に示す。図 7 B の結果から明らかな如く、DT-1/DT-2 は過剰のオリゴヌクレオチド (DT-2) と過剰の CQ の存在下でも複合体を形成しなかった。

これらの結果から、モジュレートアプタマーは TAR-1 RNA のコア因子が指向



きに並んだ繰り返しにより高い親和性を示し、配列特異的に Tat タンパク質や CQ ペプチドに結合することがわかった。

## 実施例 6

### 標的タンパク質に対する結合特異性

プロテアーゼドメインと RNA ヘリカーゼドメインを有する RNA 結合タンパク質である HCV NS3 タンパク質の存在下でモジュレートアプタマーオリゴヌクレオチド (DA-1/DA-2、DA-3/DA-4、DA-5/DA-6、DA-7/DA-8、DA-1/DA-4) とのゲルシフト結合アッセイを行った。この NS3 タンパク質はゲルシフト解析においては HIV-1

Tat タンパク質を標的タンパク質とする本発明のモジュレートアプタマーオリゴヌクレオチドとの複合体を形成しなかった (データは示さない)。

## 実施例 7

### HIV-2 Tat タンパク質との親和性

HIV-1 及び HIV-2 の Tat タンパク質は、そのコア領域 (Tat-2 のシステイン 36 からプロリン 57) に約 65%の相同性を持つことが示されている。加えて、本発明者らの研究からアプタマーが TAR-2 RNA よりも高い親和性で Tat-2 ペプチド (CP、66~97 アミノ酸、配列番号 6) に結合することがわかっており、このことから二つのタンパク質の RNA 結合の特徴は類似していることが示された。図 8 で、Tat-1 ペプチド CQ、RE と比べると効率は落ちるが、Tat-2 ペプチド CP も効率よくモジュレートアプタマー DA-5/DA-6 の二重鎖形成を促進していることが示される。

## 実施例 8

### 解析物 (Tat) 依存型結合オリゴヌクレオチドアッセイ

本発明のモジュレートアプタマーは Tat タンパク質等の標的タンパク質の検出用の道具としての可能性を持っている。図 9 に示すような診断アッセイを開発し、テストした。この解析物依存型結合オリゴヌクレオチドアッセイ (an~~alyte~~-depe~~ndent~~ hybridizing oligonucleotide assay, ADHONA) では、3'-フルオレセンオリゴヌクレオチド (DA-9、配列番号 18) と 3'-ビオチンオリゴヌクレオチド (D

A-10、配列番号 19)、ストレプトアビジンコートしたマイクロタイタープレートを用いた(図 9A 及び B)。

ストレプトアビジンコートしたマイクロタイタープレートはフィンランドの Lab systems から購入した。3'-ビオチン化オリゴヌクレオチド DA-10 (5 pmol) をストレプトアビジンプレート(ウェル)に入れ、50  $\mu$ l Tat 結合バッファー中で 10 分間室温で放置し、ストレプトアビジンに結合させた後、200  $\mu$ l Tat 結合バッファーで洗浄して結合しなかったオリゴヌクレオチドを洗い流した。次に 10 pmol の 3'-フルオレセン DA-9 と Tat-1 または Tat ペプチド(CQ または CP)を含む 50  $\mu$ l Tat 結合バッファーを加え、30℃で 30 分間放置し、最後に 200  $\mu$ l Tat 結合バッファーで再び洗浄して結合していないものを除いた。蛍光をフルオロイメーリアナライザー(FluorImager595)で解析した。488 nm の波長で励起し、530 nm で検出した。コントロールとして、Tat-1 タンパク質または Tat ペプチドの非存在下で同様の操作を行った。

結果を図 10 及び 11 に示す。10~100 pmol の CQ ペプチドの存在下で、蛍光強度はコントロールと比較して 500~2500 倍に上昇した(図 10)。また、Tat-1 タンパク質(200 pmol)を用い、10 pmol CQ ペプチドと同等の蛍光シグナルが得られた(図 11)。

上記の結果から明らかな如く、標的タンパク質である CQ ペプチドまたは Tat-1 タンパク質の存在下においてのみ複合体が検出され、標的タンパク質の存在が本発明のモジュレートアプタマーを使用して検出された。

## 実施例 9

### ほ乳類細胞核抽出物共存下における反応

効率の良い診断道具とするためには、図 9 に示したアッセイにおいて、ほ乳類細胞核抽出物のような粗精製サンプルの存在下でも量的な結果を示すことができない。粗精製サンプルはアッセイの妨げになるタンパク質や混合物、さらに相補配列のアニールを促進するタンパク質を含む可能性がある(Portman, D. S. 及び Dreyfuss, G., *EMBO J.* 13, 213-221 (1994))。そこで、上記のアッセイを DA-9/DA-10 と 8 ユニットの HeLa 核抽出物(Promega アメリカ) 40 ユ

ニットの RNase 阻害剤（東洋紡、日本）の存在下で同様のアッセイを行った。結果を図 1 2 に示す。HeLa 核抽出物のみ存在する場合は、モジュレートアプタマーオリゴヌクレオチドが二重鎖を形成せずマイクロタイターウェルに残らない（40 ユニットの RNase 阻害剤存在下でも少量の RNase 活性が残っている）。

この結果より、本発明のアッセイが感染細胞中等のほ乳類細胞核抽出物の存在下における Tat タンパク質の検出にも適していることが示された。

### 実施例 1 0

#### モレキュラービーコンアプタマーとしての利用

上記のように、DA-5 と DA-6 のようなアプタマー由来のオリゴヌクレオチドの安定な二重鎖構造の形成を、Tat または Tat 由来のペプチドにより効率よく調節できたことから、これを利用して、本発明において、初めてモレキュラービーコンアプタマーを利用した Tat またはそのペプチドの検出法を提供する。

モジュレートアプタマーの配列に基づいて、分子内に互いに相補的な 6 個の連続ヌクレオチド配列を有して単独ではステム・ループ構造をとり、かつ DA-6 と対となってモジュレートアプタマーを形成し得るオリゴヌクレオチド鎖（配列番号 2 0）の 5' 末端にクエンチャー物質 [4'-(4'-ジメチル-アミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABSYL)] を、3' 末端に蛍光物質フルオレセインを共有結合でつなげたモレキュラービーコンアプタマーを構築し、合成した (DA13 (C-A)、図 1 3 左)。具体的には、フォスフォロアミダイト (Glen Corporation、アメリカ) を用いて、RNA/DNA 合成機 (Applied Biosystem モデル 394) でオリゴヌクレオチドを合成し、5'-フルオレセン化、3'-DABSYL 化した後、当該分野において確立された方法で脱保護した。この DA13 (C-A) と DA-6 との相補対形成を図 1 3 中に示す。一方、蛍光物質とクエンチャー物質間の距離が離れたときの蛍光強度の相対的な量を評価するために、DA-13 (C-A) と完全に相補的な配列を持つ DA-13C (配列番号 2 1) を、フォスフォロアミダイト (Glen Corporation、アメリカ) を用い、RNA/DNA 合成機 (Applied Biosystem モデル 394) で合成した (図 1 3 右)。

モレキュラービーコンアプタマーを用いた Tat または Tat ペプチドの検出は、以下のようにして行った。

0.5 ml チューブ中、40 nM 大腸菌 tRNA を含む 50  $\mu$ l Tat 結合バッファー (10 mM Tris-HCl、pH7.8、70 mM NaCl、2 mM EDTA、0.01% Nonidet P-40) 中で、10 nM DA-13 (C-A) と 100 nM DA-6 を、100 nM CQ ペプチドの存在下、非存在下で混合し、30℃で 30 分放置した。この結果発せられる蛍光強度を、FluorImager (Molecular Dynamics) で測定した。比較として、同様の条件下で 10 nM DA-13 (C-A) のみ、または 10 nM DA-13 (C-A)/100 nM DA-13C についても蛍光強度を測定した。

結果を図 1 4 及び 1 5 に示すように、DA-13 (C-A) は、単独では図 1 3 左に示すステム・ループ構造をとっており、蛍光はほとんど検出されなかった。DA-6、及び標的タンパク質である CQ の両方が存在する場合、このステム・ループ構造から二重鎖構造への構造変化が起こり、蛍光強度が顕著に増加した。DA-6 オリゴまたは CQ の非存在下では、DA-13 (C-A) オリゴのこの構造変化は起こらなかった。一方、DA-13 (C-A) オリゴヌクレオチドと DA-13C オリゴヌクレオチドは CQ 非存在下においても Tat 結合バッファー中で複合体を形成し、その蛍光強度は最高値を示した。これはおそらく、DA-13 (C-A)/DA-6 複合体と比較して、DA-13 (C-A)/DA-13C の蛍光物質結合部がクエンチャー物質結合部から 25 塩基対分の距離だけ離れていること、また DA-13 (C-A)/DA-6 複合体よりも DA-13 (C-A)/DA-13C 複合体の方がより安定であることによると思われる。

上記の結果から明らかなように、DA-6 及び CQ 存在下で蛍光強度が顕著に増加することから、モレキュラービーコン [DA-13 (C-A)/DA-6] は標的タンパク質である Tat または Tat ペプチドの存在により構造変化し、この構造変化を蛍光測定でモニターすることによって、Tat を効率よく検出できることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明のモジュレートアプタマーは、従来公知の長い非モジュレートアプタマーと比較して、次のような多くの利点がある。

- 1) 短い RNA オリゴヌクレオチドは長いものと比べ合成が高効率である。
- 2) 核酸の安定化のための修飾はアプタマーの一部でよい。
- 3) コストが低い。
- 4) モジュレートアプタマーの適切な構造化は解析物により促進される。

さらに、上記の結果より本発明に係るモジュレートアプタマーによるタンパク質の検出方法は高感度で、特異性が高く、複雑な手順の解析の核酸アレイ技術にた易く応用できることが示されている。また、本発明の RNA アプタマーをリボヌクレアーゼから完全に保護するようにすれば、この方法はより良いものとなる。本発明の方法は、適切な非モジュレート、モジュレート種を組み合わせライブラリーから選択することにより、HIV Tat タンパク質だけではなく、RRE (Rev response element) のモジュレートアプタマーを使用した HIV Rev タンパク質の検出等、他のタンパク質の検出にも一般化できる。

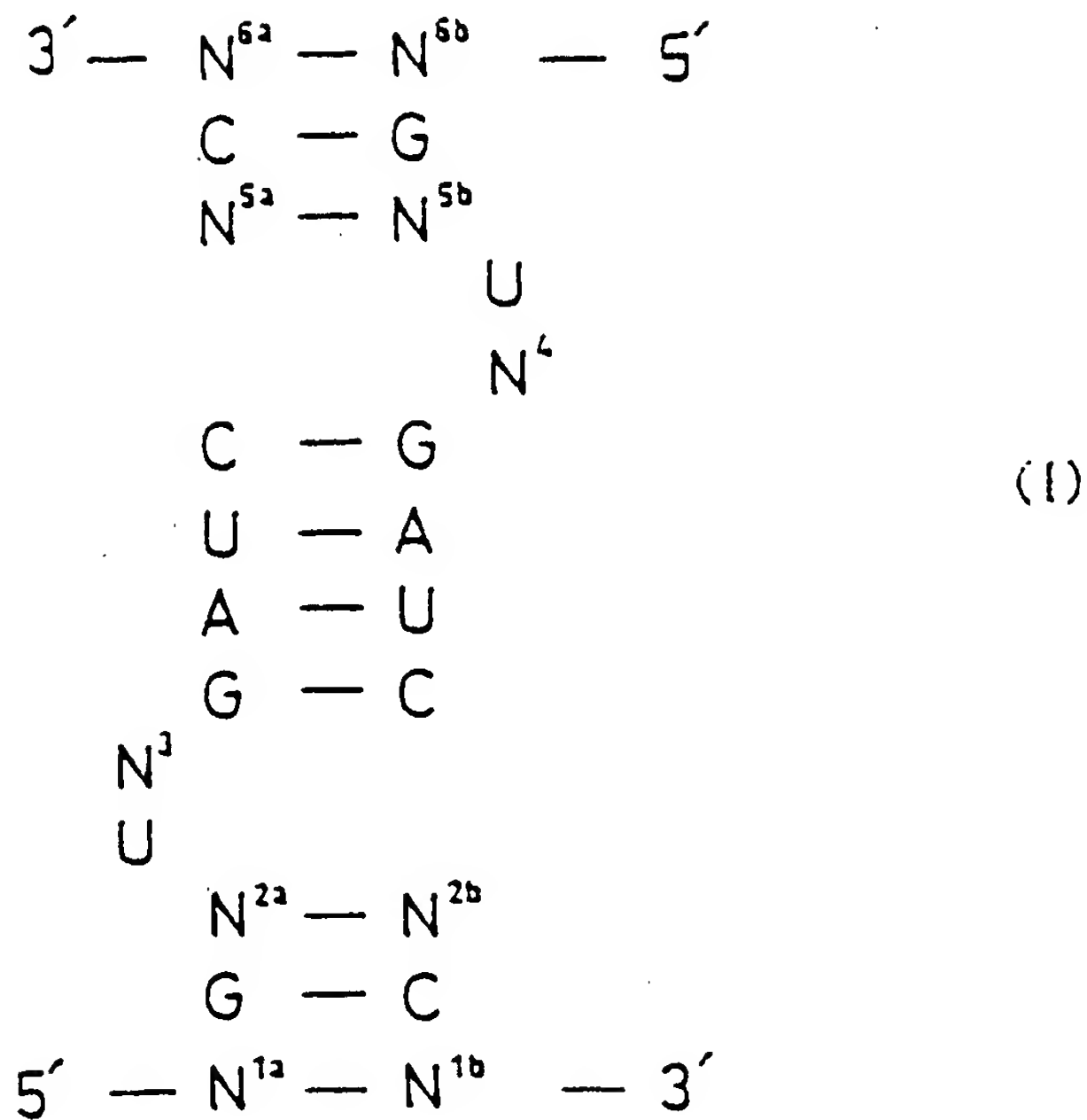
さらに、本発明のモジュレートアプタマーの一態様であるモレキュラービーコンアプタマーについても、核酸分解酵素に対して耐性を持つように修飾することも可能であり、これらの安定化モレキュラービーコンアプタマーは生きた細胞中（例えば HIV 感染細胞中）での Tat タンパク質の検出に応用できる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請 求 の 範 囲

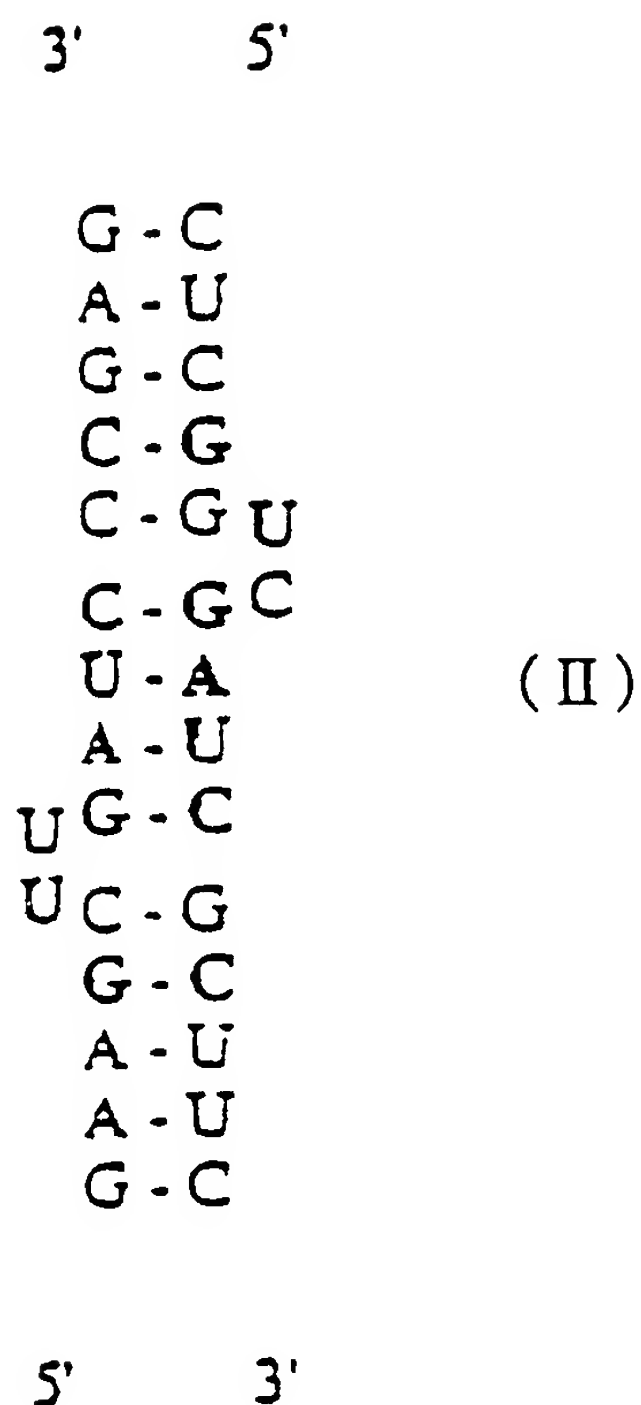
1. 相補的な二本のオリゴヌクレオチド鎖から構成されるアプタマーであって、標的タンパク質の存在下においてのみ複合体を形成し、安定化することを特徴とするモジュレートアプタマー。
2. 二本のオリゴヌクレオチド鎖の一方または双方が放射性または非放射性標識されていることを特徴とする、請求項1に記載のモジュレートアプタマー。
3. モジュレートアプタマーを構成する一方のオリゴヌクレオチド鎖が分子内に互いに相補的な4個以上の連続ヌクレオチド配列を有し、標的タンパク質の非存在下ではステム・ループ構造であることを特徴とする、請求項1に記載のモジュレートアプタマー。
4. 上記ステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖の5'または3'末端に蛍光物質を、3'または5'末端に該蛍光物質に対するクエンチャー物質を結合させたことを特徴とする、請求項3に記載のモジュレートアプタマー。
5. 標的タンパク質が HIV-1 Tat タンパク質及び/またはその断片であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか1項に記載のモジュレートアプタマー。
6. 下記の二次構造(I)によって表されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求項5に記載のモジュレートアプタマー。





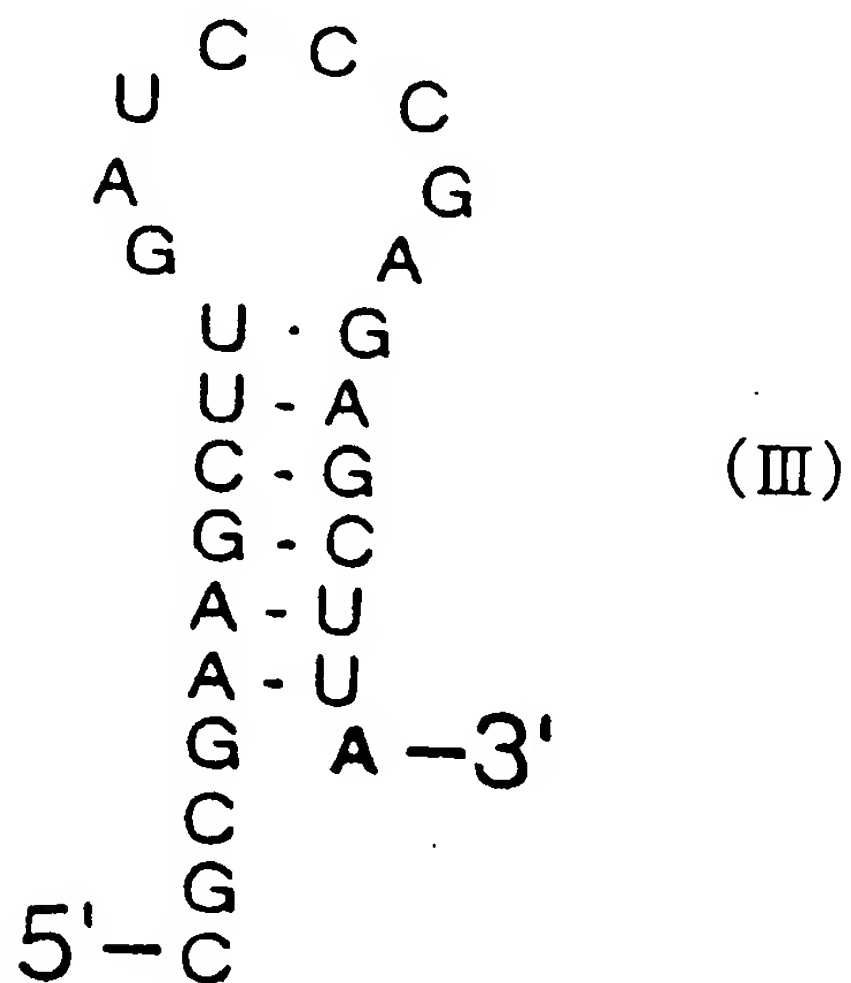
(構造中、 $N^{1a}$  及び  $N^{1b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{2a}$  及び  $N^{2b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^3$  及び  $N^4$  はそれぞれ独立に 1 または 2 個の核酸塩基であり、 $N^{5a}$  及び  $N^{5b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{6a}$  及び  $N^{6b}$  は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、そして実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

7. 下記の二次構造 (II) によって表されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求項 6 に記載のモジュレートアダマー。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

8. モジュレートアプタマーを構成する一方のオリゴヌクレオチド鎖が下記の二次構造 (III) によって表されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする、請求項3に記載のモジュレートアプタマー。



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

9. 請求項 1 に記載のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖を放射性又は非放射性標識し、標的タンパク質の存在下で形成した複合体を指標として標的タンパク質の存在及び／または量を検出することを特徴とする、標的タンパク質の検出方法。

10. 請求項 1 に記載のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖を支持体上に固定化し、放射性又は非放射性標識した他方のオリゴヌクレオチド鎖及び標的タンパク質の添加によって形成した複合体を指標として標的タンパク質の存在及び／または量を検出することを特徴とする、標的タンパク質の検出方法。

11. 請求項 4 に記載のステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖を前記標識したオリゴヌクレオチド鎖として使用する、請求項 9 または 10 に記載の方法。

12. 前記固定化が、アビジンまたはストレプトアビジン及びビオチンの特異的結合によるものである、請求項 10 または 11 に記載の方法。

13. 前記非放射性標識がフルオレセインであり、その蛍光シグナルによって前記複合体を検出することを特徴とする、請求項 9 または 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

14. 標的タンパク質が HIV-1 Tat タンパク質及び／またはその断片である、請求項 9 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

15. 下記 (a) ～ (c) ;

(a) 支持体、

(b) 支持体上に固定化される請求項 1 に記載のモジュレートアプタマーの一方のオリゴヌクレオチド鎖、

(c) 標的タンパク質の存在下で複合体を形成する、放射性または非放射性標識され

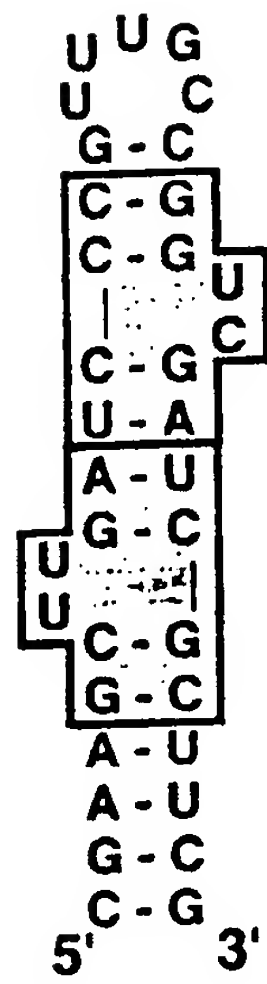
た他方のオリゴヌクレオチド鎖、  
を含んでなることを特徴とする、標的タンパク質の検出キット。

16. 標的タンパク質が HIV-1 Tat タンパク質及び／またはその断片である、請求項 15 に記載の検出キット。

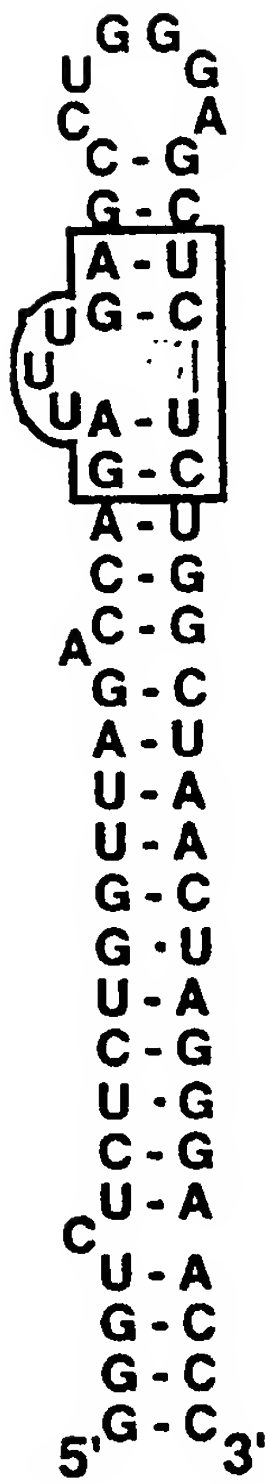
17. 請求項 6 または 7 に記載のモジュレートアダプターの 5'-鎖または 3'-鎖を前記一方のオリゴヌクレオチド鎖 (b) とし、3'-鎖または 5'-鎖を前記他方のオリゴヌクレオチド鎖 (c) とすることを特徴とする、請求項 15 に記載のキット。

18. 請求項 4 に記載のステム・ループ構造のオリゴヌクレオチド鎖を上記標識されたオリゴヌクレオチド鎖として使用する、請求項 15 または 16 に記載のキット。

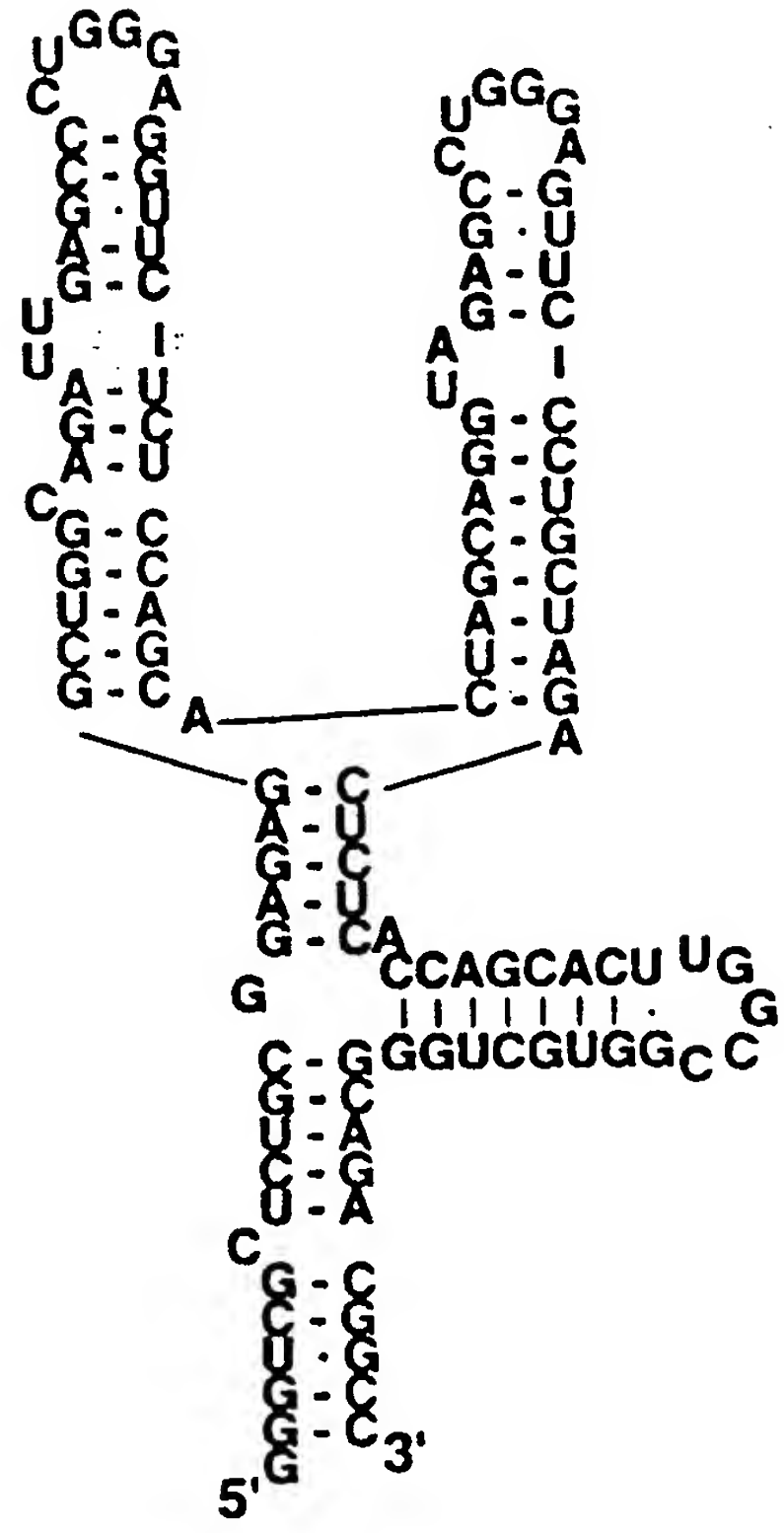
図 1



Aptamer RNA<sup>Tat</sup>



TAR-1 RNA



TAR-2 RNA

図 2

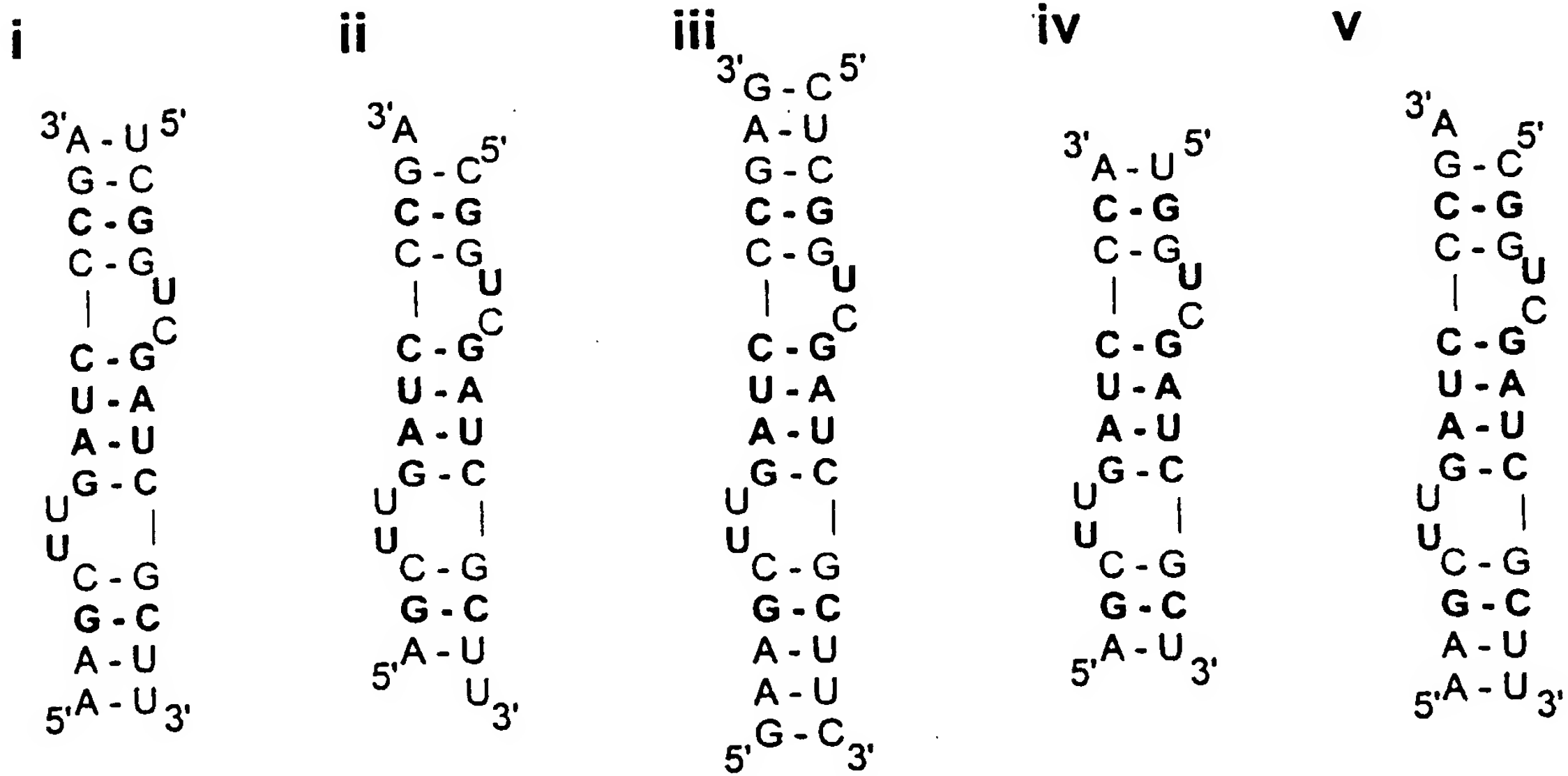




図 3

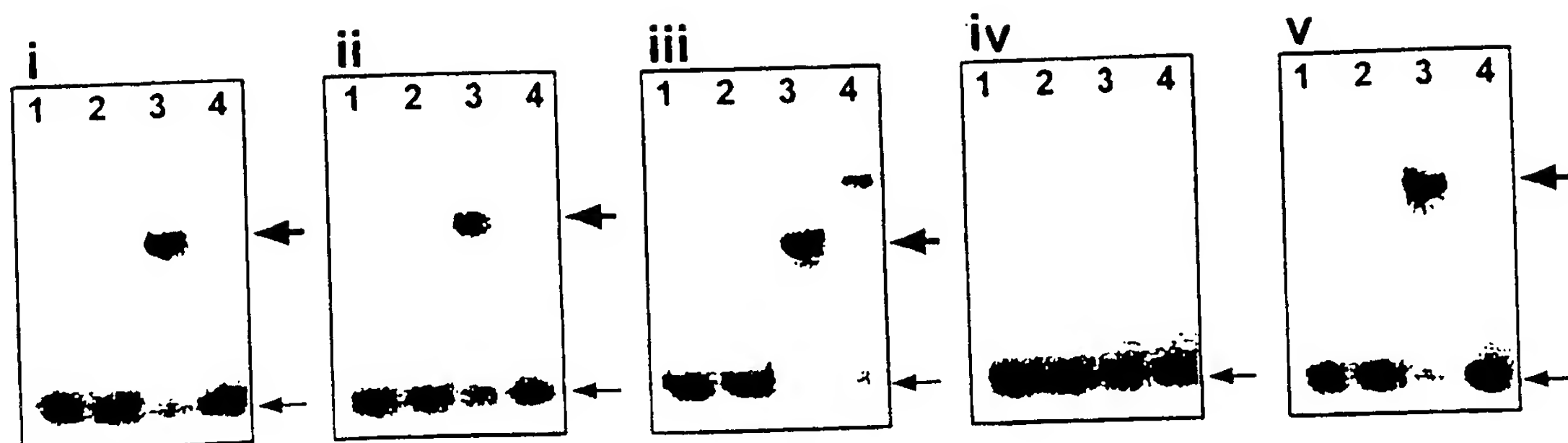


図 4

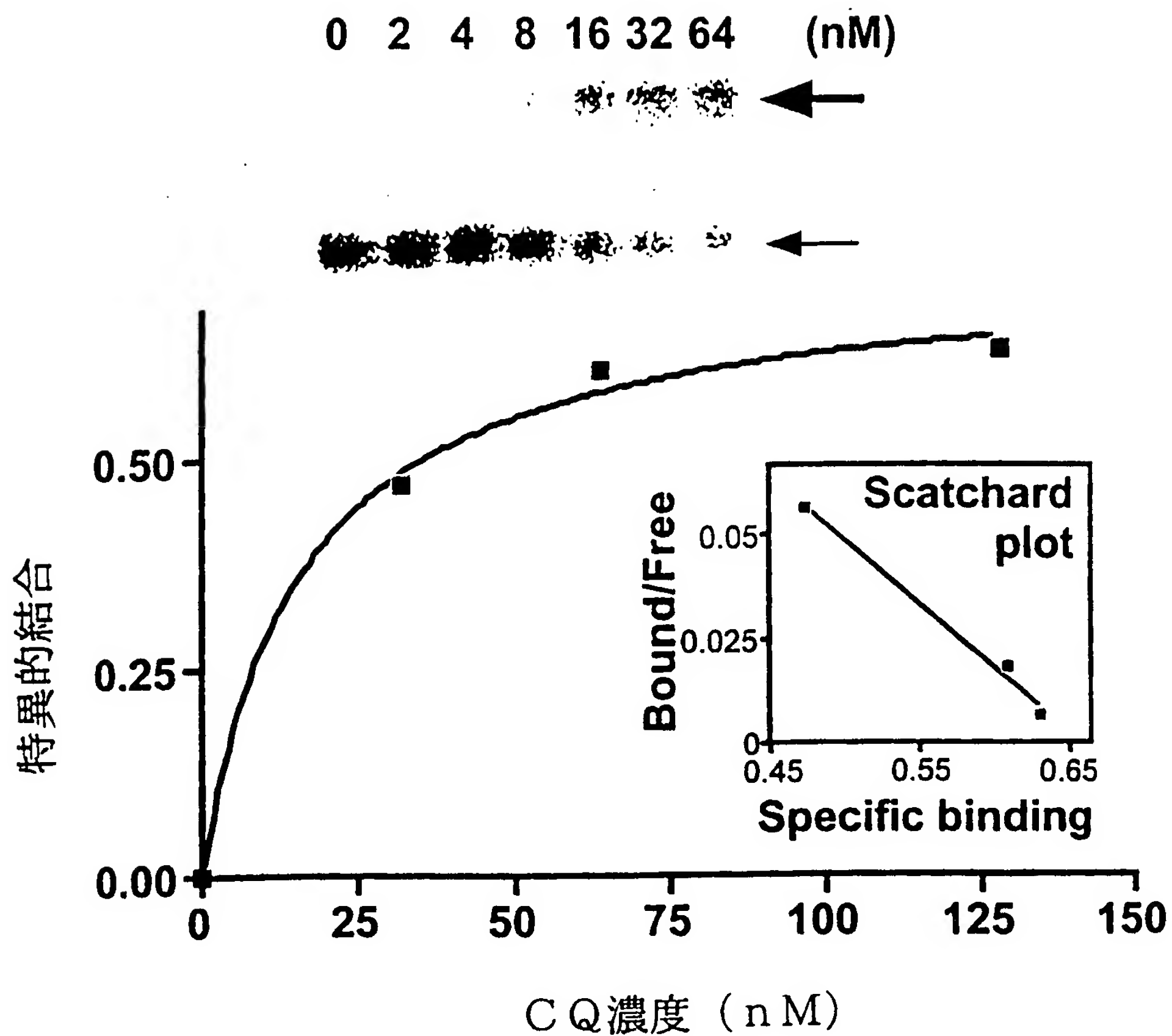


図 5

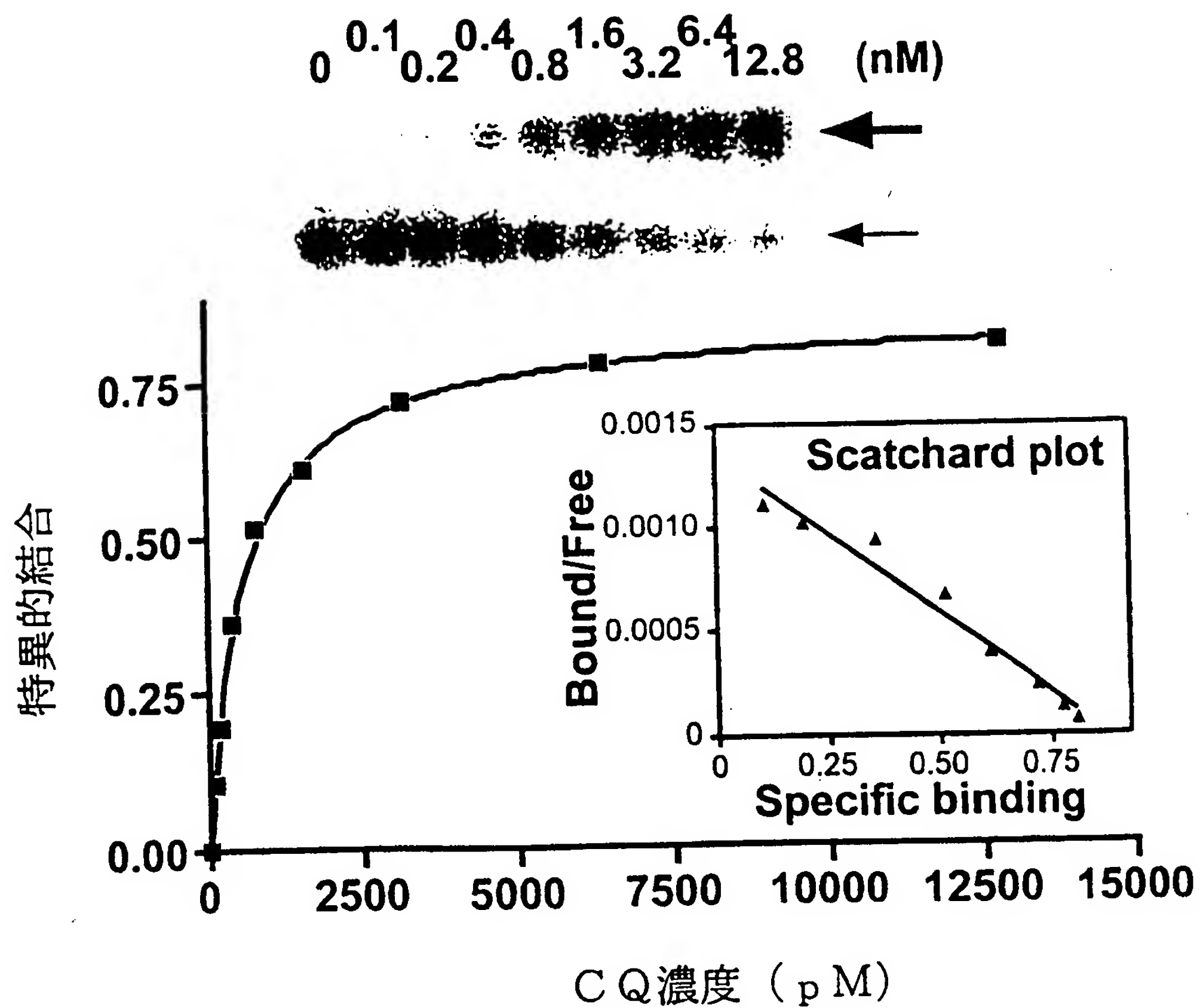
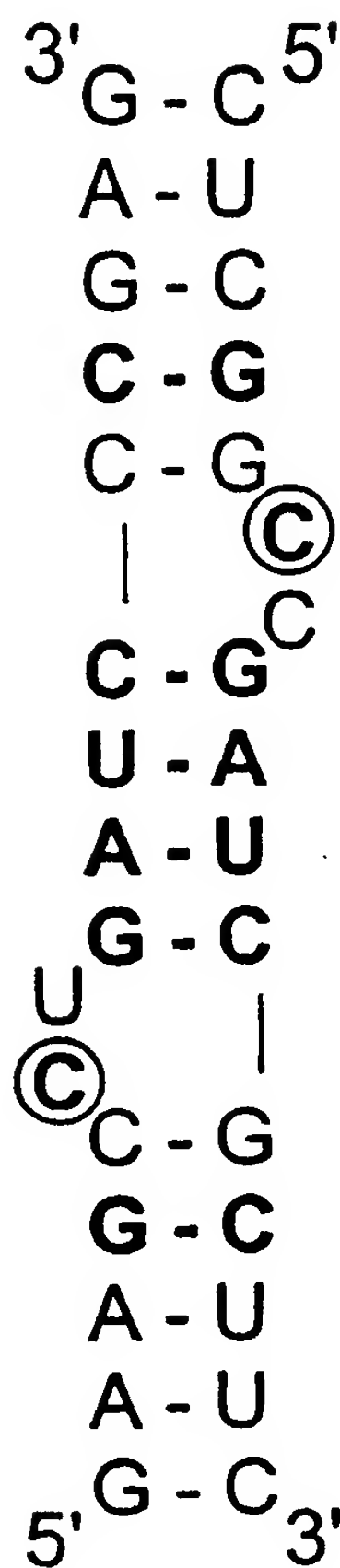


図 6

**A**



**B**

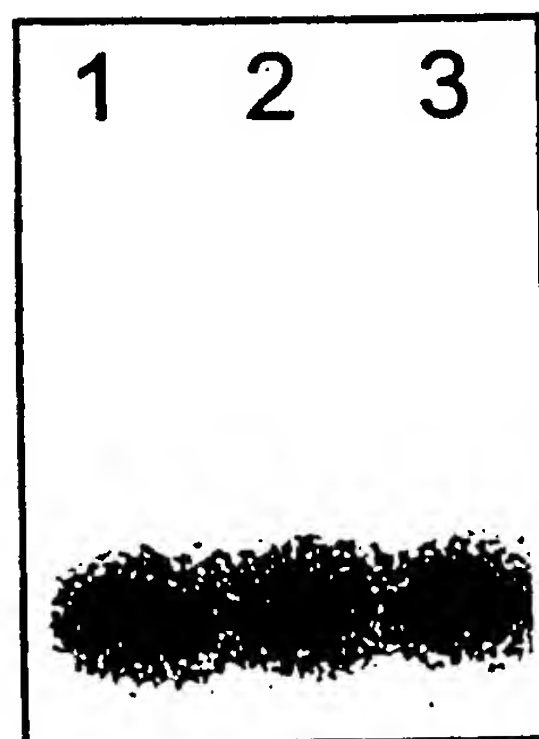
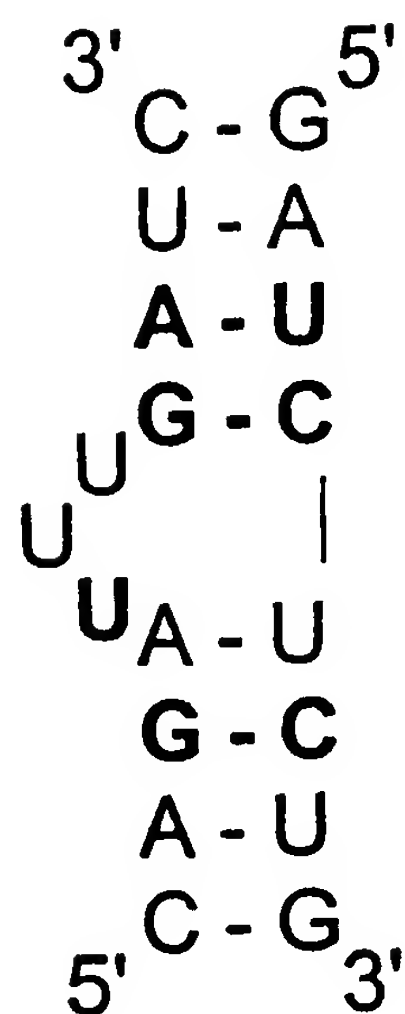


図 7

**A**



**B**

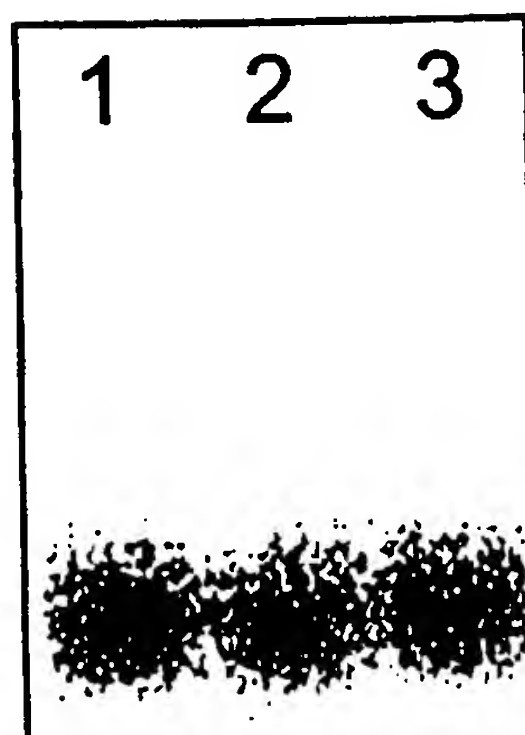


図 8

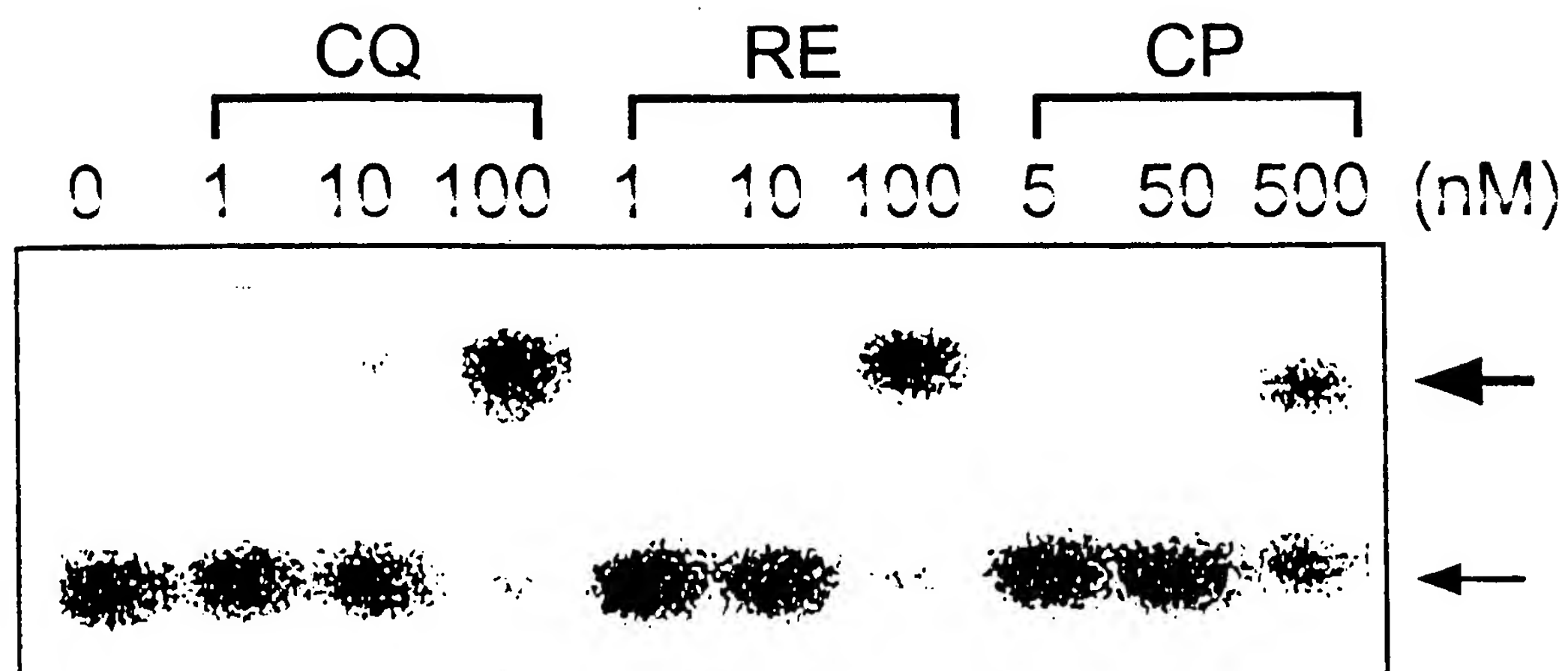




図 9

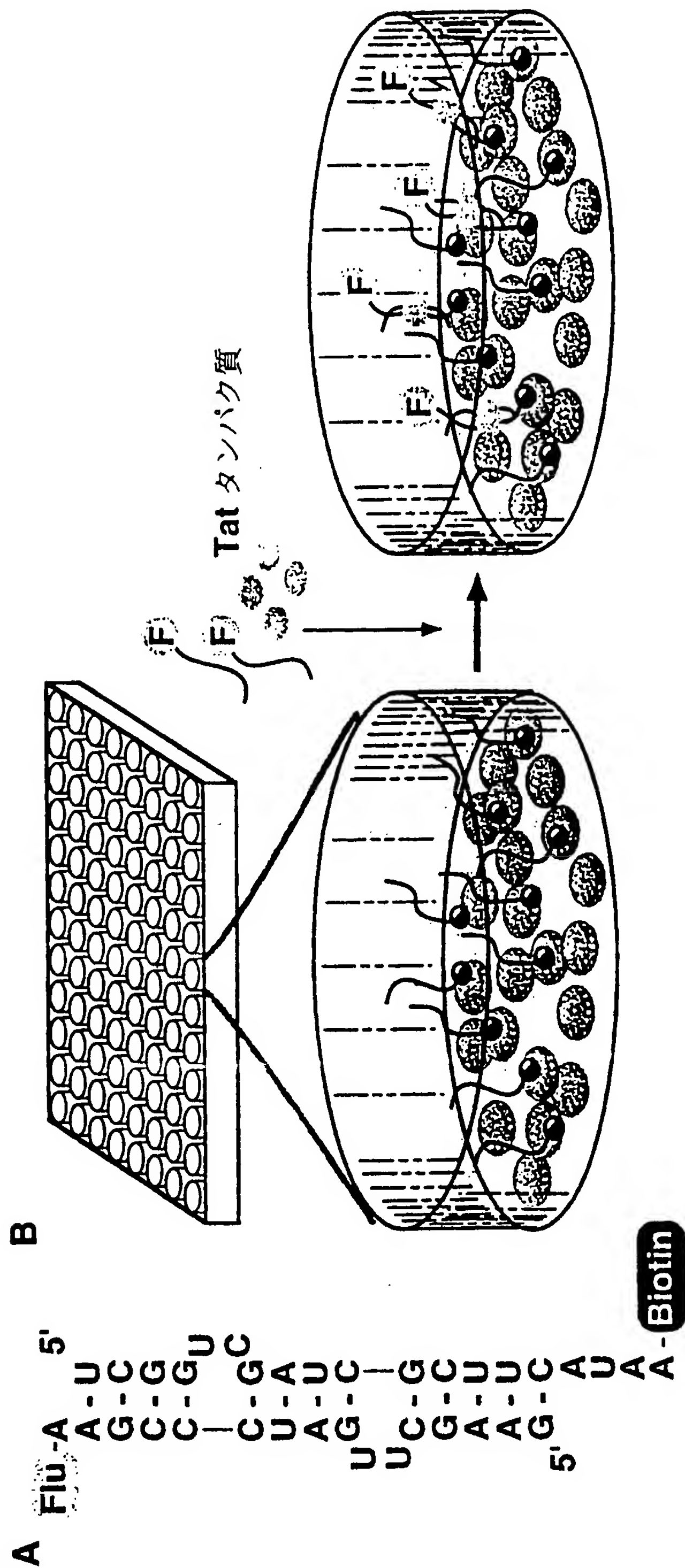


図 10

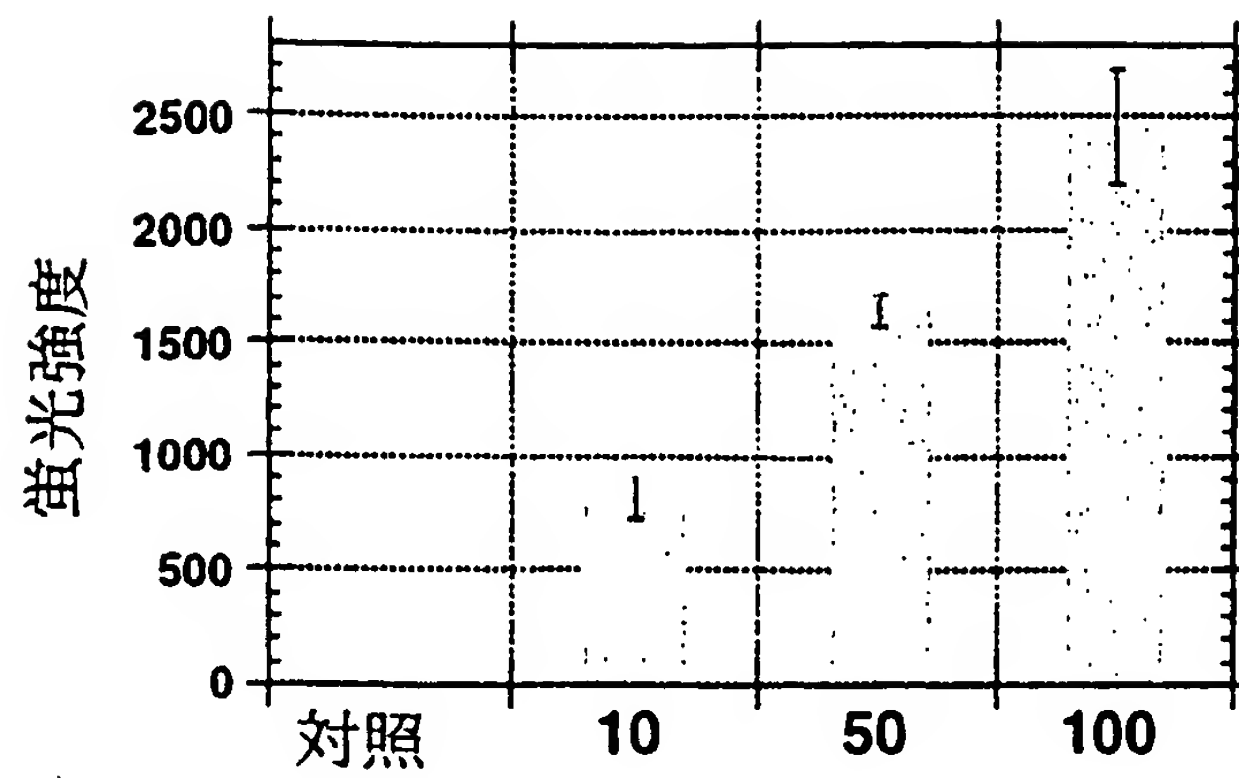


図 11

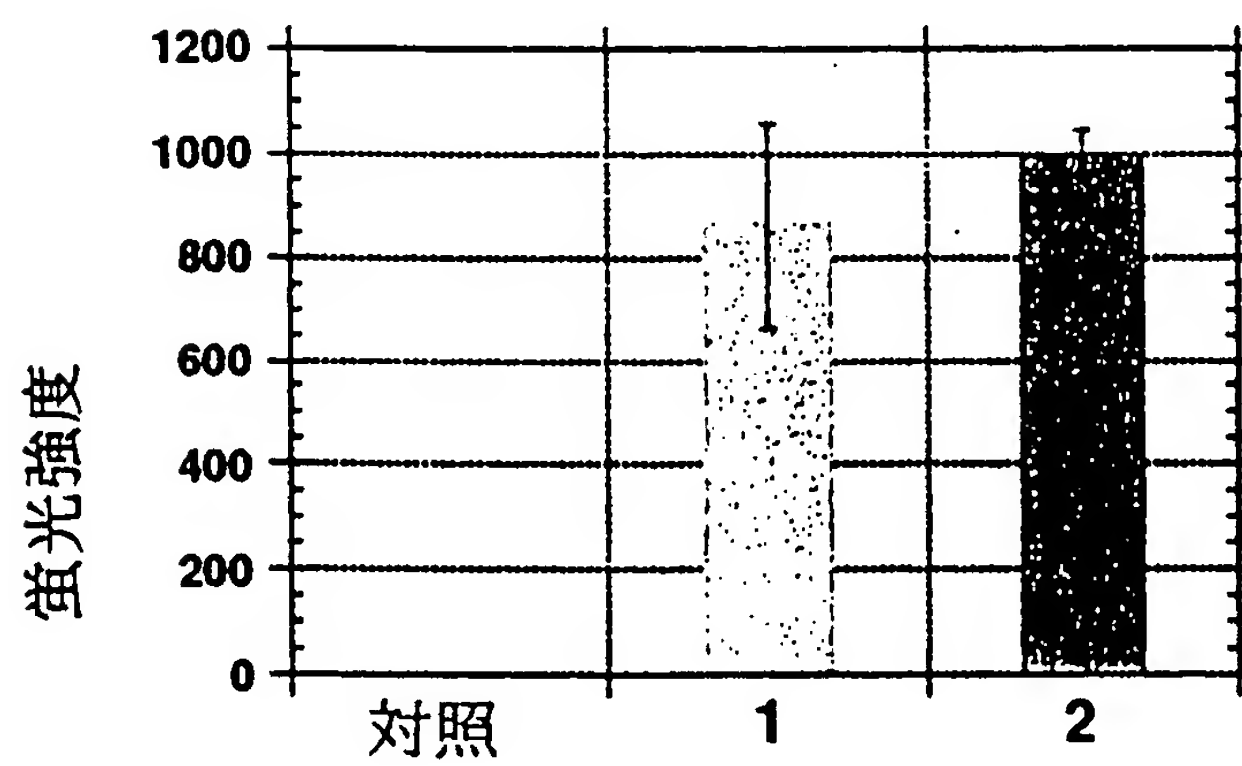


図 12

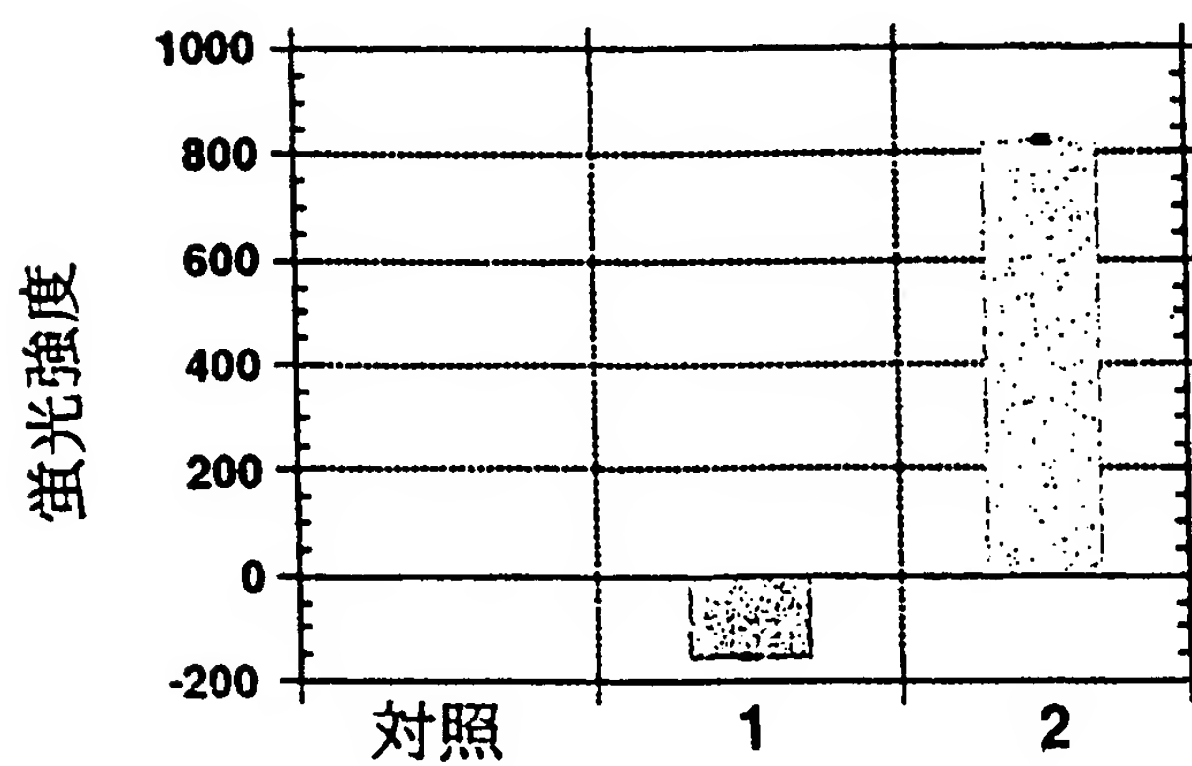


図 13

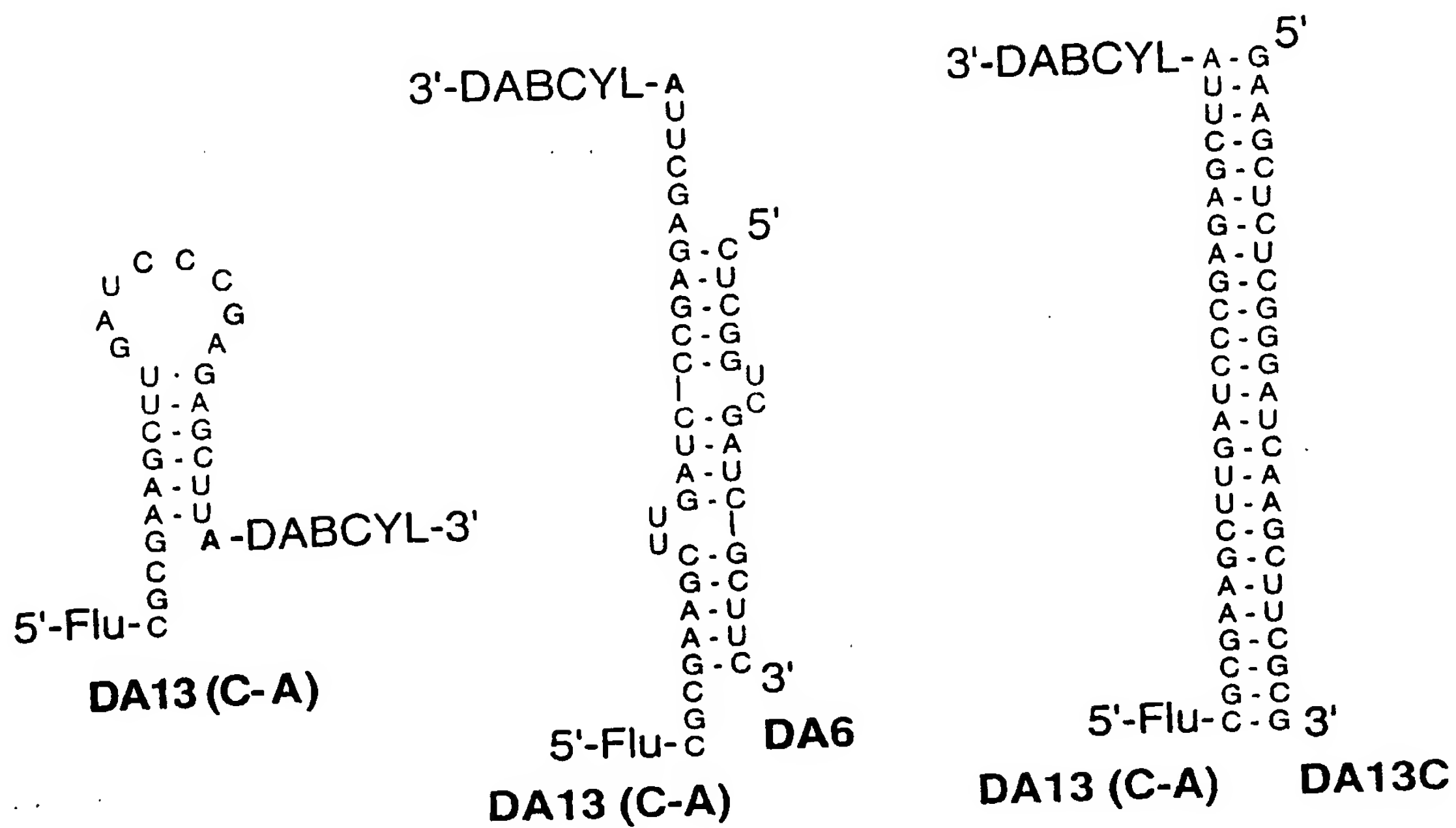


図 14

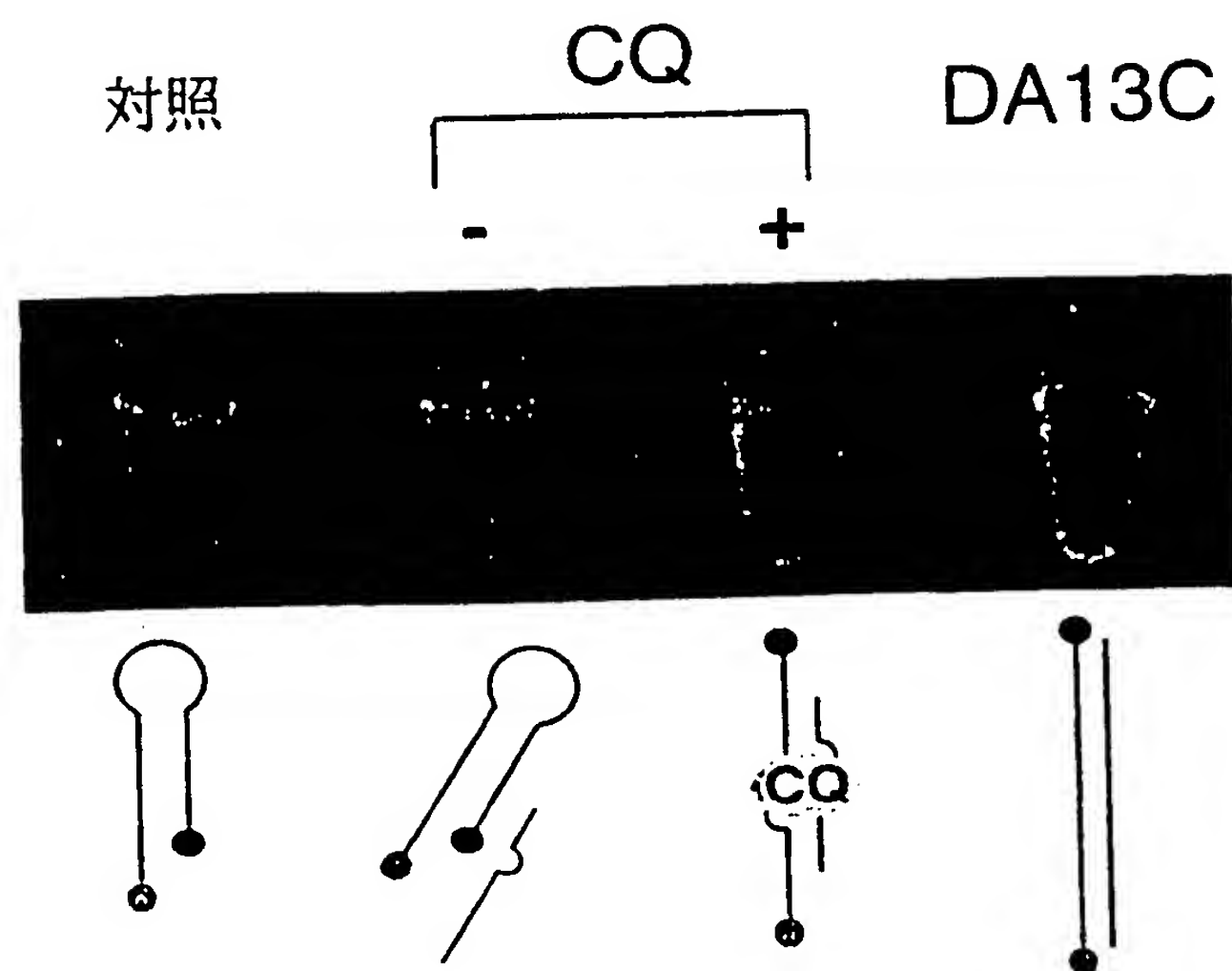
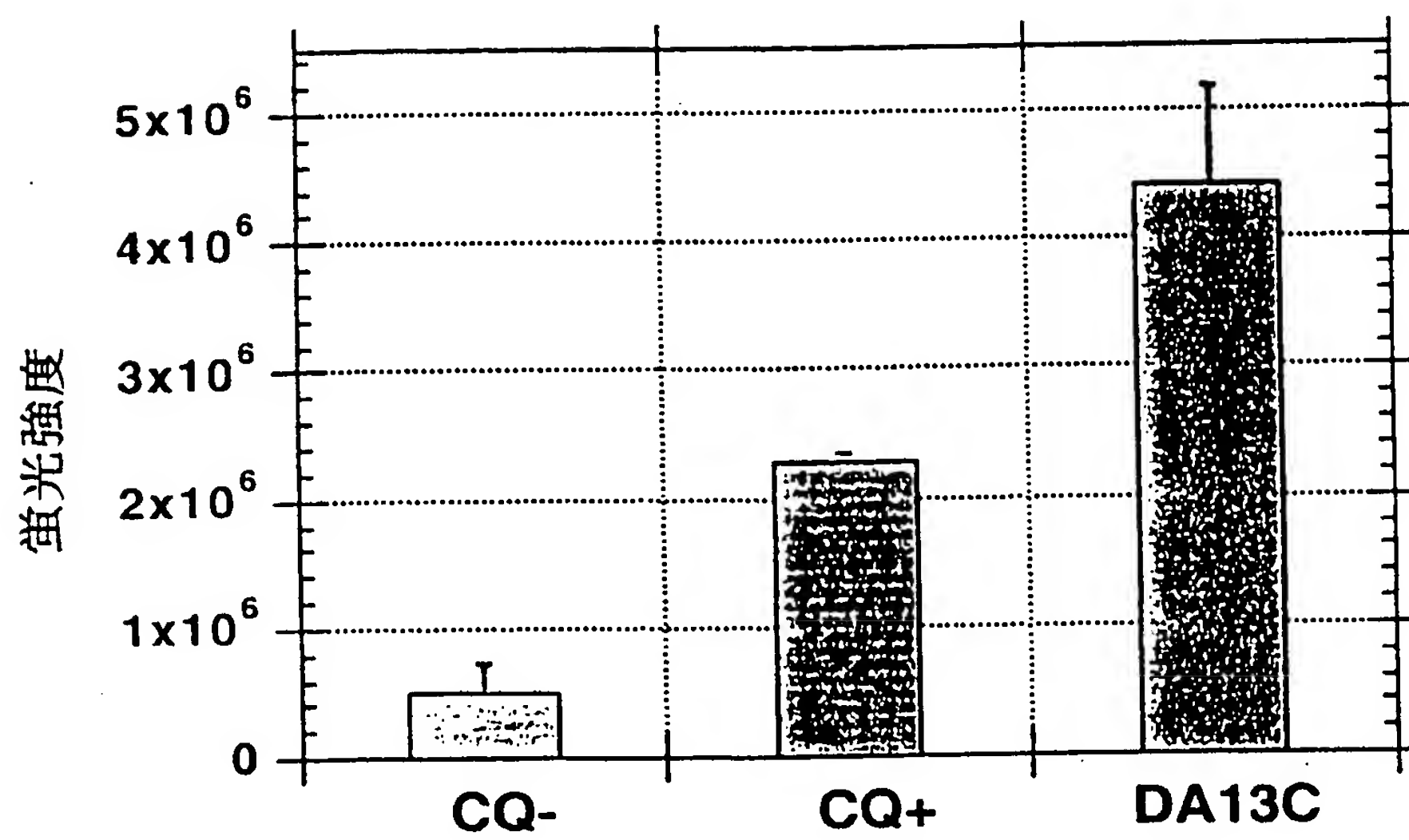


図 15



SEQUENCE LISTING

<110> Japan as represented by Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Modulate aptamers and the method of detecting target proteins using them

<130> PH-933-PCT

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer RNA for HIV-1 Tat protein

<400> 1

cgaagcuuga ucccguuugc cggucgaucg cuucg

35

<210> 2

<211> 59

<212> RNA

<213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 2

gggucucucu gguuagacca gauuugagcc ugggagcucu cuggcuaacu' agggaaccc 59

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

gggucgcucu gcggagagggc uggcagauug agcccuggga gguucucucc agcacuagca 60

gguagagccu gggaguuccc ugcuaagacuc ucaccagcac uuggccggug cugggcagac 120

ggcc

124

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Cys Phe Thr Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg

1

5

10

15

Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser

20

25

30

Leu Ser Lys Gln

35

WO 01/27263

PCT/JP00/01969

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr  
1 5 10 15

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp  
20 25 30

Pro Thr Gly Pro Lys Glu  
35

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Phe Leu Asn Lys Gly Leu Gly Ile Cys Tyr Glu Arg Lys Gly Arg  
1 5 10 15

Arg Arg Arg Thr Pro Lys Lys Thr Lys Thr His Pro Ser Pro Thr Pro  
20 25 30

<210> 7

<211> 14

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 7

aagcuugauc cga

14

<210> 8

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 8

agcuugaucc cga

13

<210> 9

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 9

gaagcuugau cccgag

<210> 10

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 10

agcuugaucc ca

<210> 11

<211> 14

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 11

ucggucgauc gcuu

<210> 12

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 12

cggucgaucg cuu

13

<210> 13

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 13

cucggucgau cgcuuc

16

<210> 14

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 14

uggucgaucg cu

12

<210> 15

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> altered 5'-half oligonucleotide

<400> 15

gaagccugau cccgag

16

<210> 16

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> altered 3'-half oligonucleotide

<400> 16

cucggccgau cgcuuc

16

<210> 17

<211> 11

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> altered 5'-half oligonucleotide

<400> 17.

cagauuugau c

11

<210> 18

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 18

gaagcuugau cccgaa

16

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'-half oligonucleotide of modulate aptamer

<400> 19

ucggucgauc gcuucauaa

19

<210> 20

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> molecular beacon aptamer

<400> 20

cgcggaagcuu gaucggcgaga gcuua

25

<210> 21

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide complementary to molecular beacon aptamer

<400> 21

gaagcucucg ggaucaagcu ucgcg

25



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01969

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG) , JICST FILE (JOIS) ,  
DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 11-127864, A (Agency of Industrial Science and Technology), 18 May, 1999 (18.05.99), Par. No. 34; Fig. 5 (Family: none)	1-3, 5-7 4, 8-18
Y	Tyagi, S. et al. "Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization" Nature Biotechnology (1996) Vol.14, No.3, pp.303-308	4, 8-18
A	T. YAMAMOTO, et al., "Shinki Kakusan Iyakuhin; Peptide Iyakuhin no Shinkahou ni yoru Tansaku", Idenshi Igaku (1998) Vol.2, No.3, pp.375-380	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 June, 2000 (16.06.00)

Date of mailing of the international search report  
27 June, 2000 (27.06.00)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01969

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/11, A61K31/70, C12Q1/68, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 11-127864, A (工業技術院長) 18.5月.1999 (18.05.99) 第34段 落, 第5図 (ファミリーなし)	1-3, 5-7 4, 8-18
Y	Tyagi, S. et al. "Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization" Nature Biotechnology (1996) 第14巻 第3号 p. 3 03-308	4, 8-18
A	山本利香ら "新規核酸医薬品・ペプチド医薬品の進化法による探索 " 遺伝子医学 (1998) 第2巻 第3号 p. 375-380	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.06.00

国際調査報告の発送日

27.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番2号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

特許庁 02-2591-1101 内線 2499



## PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/27263  
PCT/JP00/01969

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke  
Toranomom No.5 Mori Building, 3rd  
Floor  
17-1, Toranomom 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPONNOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 19 April 2001 (19.04.01)		
Applicant's or agent's file reference PH-933-PCT		
<b>IMPORTANT NOTICE</b>		
International application No. PCT/JP00/01969	International filing date (day/month/year) 29 March 2000 (29.03.00)	Priority date (day/month/year) 08 October 1999 (08.10.99)
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
**US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
**EP**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 19 April 2001 (19.04.01) under No. WO 01/27263

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---